

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de mecanismos moleculares asociados a la
resistencia de células de melanoma a compuestos
inhibidores de la vía de las MAP quinasas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lucía Benito Jardón

DIRECTOR

Joaquín Teixidó Calvo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de mecanismos moleculares
asociados a la resistencia de células de melanoma
a compuestos inhibidores de la vía de las MAP
quinasas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lucía Benito Jardón

DIRECTOR

Joaquín Teixidó Calvo

A mis padres y a mi hermana,

A Alejandro,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a Joaquín por haberme permitido realizar esta Tesis en su laboratorio bajo su dirección. Gracias por estar siempre dispuesto a escuchar nuestras dudas y discusiones de resultados, por tu cercanía y, en definitiva, por contribuir a generar un muy ambiente de trabajo.

Gracias a María Antonia Lizarbe, y a mi actual tutora Nieves Olmo por guiarme en la gestión de los trámites de la Tesis en la situación tan excepcional que hemos vivido durante este año.

Gracias a todos los colaboradores, en particular a Azucena Esparis Ogando y Ángeles García Pardo, entre otros, que han contribuido a este trabajo con útiles consejos y discusiones, así como con anticuerpos y reactivos.

Mil gracias a mis compañeras de laboratorio, por ser un claro ejemplo de trabajo en equipo y por haber sido prácticamente mi familia en Madrid durante estos años. Gracias infinitas Marta, por iniciar estos proyectos, por ser mi mentora y echarme una mano siempre, incluso en la distancia. Trabajar contigo (y hacer múltiples planes al margen) fue una enorme suerte. Gracias Nohemí, por el apoyo inmenso que prestas, tanto laboralmente como en lo personal, teniendo siempre esos detalles en el momento justo que te arreglan el día y la semana. Eres única, ¡sin ti el 141 se desmoronaría! Gracias Silvia, por hacerme sentir una más en el laboratorio desde el primer día, y por poder contar contigo siempre, dentro y fuera del CIB. A Paloma, Cristina y Celeste, por su participación en la caracterización de las células resistentes. A Yaiza, Mónica, y compañeros/as pasajeros/as del laboratorio: Anna, Roger, Álex, Celia, Patri, y nuestra profesora de italiano Sam.

Gracias a las chicas del 142 (“las Gelis”), en especial a Noemí. A los vecinos/as del 143, a Emi y a Sheila. Gracias Álvaro por hacerme ver que hay vida en la planta baja y por unos cafés tan maravillosos. A los de la tercera: Alberto, Laura, Cristina, por nuestras comidas arreglando el mundo y la pandemia de coronavirus. Gracias Rubén por leerme mi Tesis y por darme algún consejo (o prestarme algún que otro reactivo) cuando lo he necesitado.

A los Paraguayos, varios ya distribuidos por el mundo. Gracias por tan buenísimos momentos, ya sea presencialmente o en *streaming*. Gracias a las chicas de la MODA. A Marta, por currarte la portada de la Tesis y por tus consejos de diseñadora gráfica profesional. Gracias Mangel por tus recomendaciones sobre gamas cromáticas, y por probablemente contagiarme algo del orden y la claridad de tus seminarios.

Finalmente, gracias a mi familia. A mis padres, por haberme animado desde el principio a estudiar lo que me gustaba, y por enseñarme a relativizar y valorar lo realmente importante en la vida. A mi hermana, por estar presente siempre y ser mi referente como científica y mucho más. Es un orgullo enorme y una inspiración ver todo lo que consigues. Y gracias Alejandro, por haberme dado el empujón para cambiar de Tesis y de ciudad, por ayudarme a ver las soluciones más que los problemas, y por acompañarme durante todo este tiempo en la distancia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	19
1. El melanoma	21
1.1. Mutaciones en melanoma	22
1.2. Progresión del melanoma	24
2. La familia de las MAP quinasas	27
2.1. La vía de señalización MAPK/ERK	28
2.2. Regulación <i>feedback</i> negativa de la vía MAPK/ERK	31
2.3. La mutación BRAF ^{V600E} y la vía MAPK/ERK	32
3. El tratamiento del melanoma	34
3.1. Inhibición de BRAF	35
3.1.1. Activación de la vía MAPK/ERK por inhibidores de BRAF	37
3.2. Inhibidores de MEK y tratamiento combinado con inhibidores de BRAF	38
3.2.1. Inhibidores de MEK en tumores con mutación en Ras	39
3.3. Inhibidores de ERK: SCH772984	40
3.4. Inmunoterapia	42
4. Mecanismos de resistencia a inhibidores de MAP quinasas	43
4.1. Alteraciones en MAP quinasas y en la sensibilidad a inhibidores de la vía MAPK/ERK	44
4.2. Alteraciones en la activación de Ras	45
4.3. Activación de receptores tirosina quinasa: respuesta adaptativa y resistencia	46
4.4. Activación de la vía PI3K/Akt	48
4.5. Otras vías implicadas en resistencia a inhibidores de las MAP quinasas	50
4.6. Microambiente tumoral y resistencia	53
4.7. Alteraciones en la expresión de microRNAs	54
4.7.1. miRNAs: biogénesis y función	54
4.7.2. miRNAs en la progresión del melanoma y en resistencia a terapias dirigidas	55
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
Líneas celulares	63
Generación de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	63
Anticuerpos, inhibidores y factores de crecimiento	64
Vectores de expresión y RNA de interferencia	65
Transfecciones transitorias	66
Silenciamiento génico estable mediante transducción lentiviral	67

<i>Western blotting</i>	67
Ensayos de actividad GTPasa (<i>pull-down</i>)	68
Ensayos de viabilidad celular	69
Ensayos de proliferación celular	69
Ensayo de formación de colonias en <i>Soft Agar</i>	69
Ensayo de formación de melanosferas	70
Ensayo de crecimiento de esferoides 3D	70
Ensayo de invasión celular a través de Matrigel	70
Microscopía confocal	71
Análisis mediante <i>arrays</i> de la fosforilación de receptores tirosina quinasa	71
Análisis mediante <i>arrays</i> de la expresión de factores de crecimiento	71
Análisis del ciclo celular	72
Ensayo de apoptosis celular	72
Transcripción inversa y PCR cuantitativa (qPCR)	72
Secuenciación de DNA	75
Análisis del crecimiento de tumores <i>in vivo</i>	75
Análisis estadístico	76
RESULTADOS	77
1. Generación y caracterización de líneas celulares de melanoma con resistencia simple al inhibidor de ERK SCH772984, y con resistencia doble a vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH772984	79
1.1. Generación de líneas celulares de melanoma con resistencia a SCH772984	79
1.2. Análisis de las características proliferativas de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER	82
1.3. Análisis de las propiedades adhesivas e invasivas de las células A375-ER	83
1.4. Generación de líneas celulares de melanoma con resistencia combinada a vemurafenib y trametinib, o a vemurafenib y SCH772984	85
2. Identificación de alteraciones en rutas de señalización en las células resistentes, y determinación de su implicación en las resistencias	86
2.1. Análisis de la vía MAPK/ERK en células resistentes a SCH	86
2.2. Análisis de la activación de Akt en células resistentes a SCH	88
2.3. Análisis de la expresión de proteínas de ciclo celular en células A375-ER y determinación de su posible implicación en resistencia	90
2.4. Análisis de la expresión de proteínas anti-apoptóticas en células con resistencia a SCH	94
2.5. Análisis de la activación de Src quinasas en células resistentes a SCH	96
2.6. Análisis de la expresión de MITF en células resistentes a SCH	98
2.7. Análisis de la activación de la vía MEK5-Erk5 en células resistentes a SCH	99
2.8. Estudio de la implicación de Erk5 en resistencia a SCH	101

2.9.	Caracterización de células de melanoma con doble resistencia a VMF y TMT o a VMF y SCH. Análisis de la activación de Erk1/2, Erk5 y Akt	103
2.10.	Análisis de la expresión de proteínas <i>scaffold</i> de la vía MAPK/ERK	105
2.11.	Estudio de la expresión y función de fosfatasas de la familia DUSP en las células resistentes	105
2.12.	Estudio del papel de PAK1 y PAK2 en la activación de Erk5 en células resistentes	107
2.13.	Identificación de receptores tirosina quinasa activados en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	111
2.14.	Estudio del papel de IGF-1R en resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK	114
2.15.	La activación de MEK5-Erk5 y PI3K-Akt en las células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK depende de la estimulación <i>upstream</i> de IGF-1R	117
2.16.	Recuperación de fosfo-Erk1/2 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Caracterización molecular	118
2.17.	Sobreexpresión de IGFBP5 en células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	126
2.18.	Caracterización molecular de células de melanoma resistentes a SCH con mutación en N-Ras	129
3.	Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib e identificación de sus dianas proteicas	131
3.1.	Implicación de miR-204-5p y miR-211-5p en resistencia a vemurafenib <i>in vivo</i>	131
3.2.	Análisis de mecanismos implicados en el aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células A375-VR	132
3.3.	Análisis de la expresión de proteínas diana de miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib	134
DISCUSIÓN		137
1.	Generación y caracterización de líneas celulares de melanoma con resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK	139
2.	Identificación de alteraciones en rutas de señalización en las células resistentes y determinación de su implicación en las resistencias	140
2.1.	Las células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a las combinaciones de inhibidores de BRAF/MEK o de BRAF/ERK muestran una reducción de la activación de Erk1/2	140
2.2.	Implicación de la vía IGF-1R-MEK5-Erk5 en la resistencia de células de melanoma a inhibidores de ERK o a las combinaciones de inhibidores de BRAF/MEK o de BRAF/ERK	141
2.3.	Activación de la vía PI3K/Akt en células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a los tratamientos combinados de inhibidores de MAP quinasas	143
2.4.	Sobreexpresión de IGFBP5 en células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a la inhibición de BRAF/MEK	144

2.5.	Papel de las quinasas PAK en la activación de la vía MEK5-Erk5 y en la resistencia de células de melanoma a inhibidores de ERK o a la inhibición de BRAF/MEK	145
2.6.	Papel de proteínas del ciclo celular en la resistencia de células de melanoma a inhibidores de ERK	146
2.7.	Posible papel de proteínas <i>scaffold</i> en la disminución de la activación de la vía MAPK/ERK en las células resistentes	147
2.8.	Recuperación de fosfo-Erk1/2 por TGF- α en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	148
2.9.	Modelo de resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en células de melanoma	150
3.	miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib	151
CONCLUSIONES		155
BIBLIOGRAFÍA		159
ANEXOS		195
•	ANEXO I: Díaz-Martínez M., Benito-Jardón L., Alonso L., Koetz-Ploch L., Hernando E., Teixidó J. (2018) 'miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma', <i>Cancer Research</i> , 78(4), pp. 1017-1030.	199
•	ANEXO II: Díaz-Martínez M., Benito-Jardón L., Teixidó J. (2018) 'New insights in melanoma resistance to BRAF inhibitors: a role for microRNAs', <i>Oncotarget</i> , 9(83), pp. 35374-35375.	215
•	ANEXO III: Benito-Jardón L., Díaz-Martínez M., Arellano-Sánchez N., Vaquero-Morales P., Esparís-Ogando A., Teixidó J. (2019) 'Resistance to MAPK inhibitors in melanoma involves activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 pathway', <i>Cancer Research</i> , 79(9), pp. 2244-2256.	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Progresión del melanoma cutáneo	26
Figura 2.	Señalización de las MAP quinasas	28
Figura 3.	Vía de señalización de Erk1/2	31
Figura 4.	La ruta MAPK/ERK en células con mutación en BRAF	34
Figura 5.	Cronología de terapias aprobadas por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico	35
Figura 6.	Mecanismo de acción del vemurafenib en monómeros y en dímeros de RAF	37
Figura 7.	Mecanismo de acción de los inhibidores de ERK	41
Figura 8.	Resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK por alteraciones en la vía MAPK/ERK	45
Figura 9.	Mecanismos de resistencia dependientes de Ras	46
Figura 10.	Resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK por la activación de receptores tirosina quinasa	47
Figura 11.	La ruta PI3K/Akt y sus interacciones con la vía MAPK/ERK	50
Figura 12.	Regulación de la transición entre las fases G ₁ y S del ciclo celular	52

Figura 13. Caracterización de las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH	79
Figura 14. La resistencia a SCH de las células A375-ER es independiente de la presencia continua del inhibidor	80
Figura 15. Resistencia de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER a otros inhibidores de la vía MAPK/ERK	81
Figura 16. Caracterización de las células SK-Mel 103 resistentes a SCH	82
Figura 17. Características proliferativas de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER	83
Figura 18. Características adhesivas de las células A375-ER	84
Figura 19. Bloqueo de la invasión <i>in vitro</i> de las células A375-ER	84
Figura 20. Caracterización de células resistentes a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK, o de BRAF y ERK	85
Figura 21. Resistencia de las células A375-VR/TR a SCH	86
Figura 22. Análisis de la activación de la vía MAPK/ERK en células resistentes a SCH	87
Figura 23. Análisis de la activación de Ras y de la expresión de <i>NF1</i> y SPRED1 en células resistentes a SCH	88
Figura 24. Análisis de la activación de la vía PI3K/Akt en células resistentes a SCH	89
Figura 25. Efecto de la inhibición de Akt en la resistencia a SCH de las células A375-ER	90
Figura 26. Análisis del ciclo celular de las células A375 y A375-ER	91
Figura 27. Análisis de la expresión de Cdk5 y ciclinas implicadas en la transición G ₁ -S en células resistentes a SCH	92
Figura 28. Las células A375-ER son resistentes al inhibidor de Cdk4/6	93
Figura 29. Silenciamiento de Cdk4, Cdk4/2 o Cdk4/6 en células resistentes a SCH y su efecto en viabilidad celular	94
Figura 30. Estudio de la expresión de proteínas anti-apoptóticas en células resistentes a SCH	95
Figura 31. Efecto del tratamiento con un inhibidor de Mcl-1 en la resistencia de células A375-ER a SCH	96
Figura 32. Análisis de la fosforilación de SFK en células A375-ER	96
Figura 33. Efecto de la inhibición de SFK por saracatinib en la resistencia a SCH de las células A375-ER	97
Figura 34. Efecto de la inhibición de SFK por eCF506 en la resistencia a SCH de las células A375-ER	98
Figura 35. Análisis de la expresión de MITF en células parentales y resistentes a SCH	98
Figura 36. Aumento de la fosforilación de Erk5 dependiente de MEK5 en células resistentes a SCH	99
Figura 37. Expresión de genes regulados por Erk5 en las células A375 y A375-ER	100
Figura 38. Análisis de la fosforilación de Erk1/2 y Erk5 en clones de células resistentes a SCH	100
Figura 39. Efecto de la inhibición de la vía MEK5-Erk5 en la viabilidad y la proliferación de las células resistentes a SCH	101
Figura 40. Efecto de la expresión de una forma dominante negativa de MEK5 en la proliferación de células resistentes a SCH	102

Figura 41. Efecto del silenciamiento de Erk5 en la proliferación de células resistentes a SCH	103
Figura 42. Análisis de la activación de Erk1/2, Erk5 y Akt en células resistentes a la combinación de inhibidores de la vía MAPK/ERK	104
Figura 43. Análisis de la proliferación de las células resistentes a vemurafenib/trametinib o a vemurafenib/SCH en presencia del inhibidor de MEK5	104
Figura 44. Análisis de la expresión de <i>IQGAP1</i> , <i>KSR1</i> y <i>KSR2</i> en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	105
Figura 45. Expresión de <i>DUSP6</i> y <i>DUSP5</i> en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	106
Figura 46. Análisis de la fosforilación de Erk1/2 y Erk5 en células resistentes con sobreexpresión de DUSP6	107
Figura 47. Análisis de la activación de Rac1 y Cdc42 en células resistentes a SCH o a la combinación de vemurafenib y trametinib	108
Figura 48. Análisis de la expresión de <i>PAK1</i> y <i>PAK2</i> en células resistentes	108
Figura 49. Análisis de la expresión y fosforilación de <i>PAK2</i> y de su posible papel en la fosforilación de Erk5 en células A375-VR/TR	109
Figura 50. Análisis de la posible implicación de <i>PAK2</i> en la fosforilación de Erk5 en células A375-ER	110
Figura 51. Proliferación de las células A375-VR/TR tras el silenciamiento de <i>PAK2</i>	110
Figura 52. Análisis de la fosforilación de RTKs en células parentales y resistentes a SCH	111
Figura 53. La resistencia a SCH de las células A375-ER es independiente del aumento de la activación de ErbB2	112
Figura 54. Análisis de la expresión y activación de IGF-1R en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	113
Figura 55. Análisis de la expresión de BRAF y de su posible implicación en la regulación de la expresión de IGF-1R en células resistentes	114
Figura 56. La inhibición de IGF-1R reduce la resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK	115
Figura 57. Efecto de la inhibición de IGF-1R en el crecimiento celular 3D	116
Figura 58. Inhibición por LST del crecimiento <i>in vivo</i> de tumores de células resistentes a SCH	116
Figura 59. Activación de Ras y Erk5 dependiente de IGF-1R en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	117
Figura 60. Activación de Akt dependiente de IGF-1R en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	118
Figura 61. Mantenimiento de la inhibición de la fosforilación de Erk1/2 en células resistentes a SCH en ausencia del inhibidor	118
Figura 62. Recuperación de fosfo-Erk1/2 en las células resistentes a SCH tras la incubación con el medio condicionado por las células parentales	119
Figura 63. Factores de crecimiento secretados por las células A375 y A375-ER	120
Figura 64. Recuperación de fosfo-Erk1/2 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK tras la incubación con TGF- α	121

Figura 65. Efecto de la neutralización de TGF- α en la recuperación de fosfo-Erk1/2 en células resistentes	122
Figura 66. Expresión de EGFR en células parentales y resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	122
Figura 67. La inhibición de EGFR impide la recuperación de fosfo-Erk1/2 por TGF- α en células resistentes	123
Figura 68. Cinética de la reactivación de la vía MAPK/ERK por TGF- α en células resistentes	124
Figura 69. Análisis de la expresión de <i>TGFA</i> en células parentales, resistentes y en melanocitos Mel-STV-BRAF ^{V600E}	125
Figura 70. Proliferación y resistencia a SCH de las células A375-ER en presencia de TGF- α	126
Figura 71. Expresión de IGFBP5 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK	127
Figura 72. Efecto del silenciamiento de IGFBP5 en la fosforilación de IGF-1R	128
Figura 73. Análisis de la expresión de <i>IGFBP5</i> en tumores procedentes de ratones tratados con vemurafenib y trametinib	129
Figura 74. Análisis de la activación de Erk1/2 y MEK1/2 en células SK-Mel 103 resistentes a SCH	129
Figura 75. Análisis de la activación de Ras, Erk5 y Akt en células SK-Mel 103-ER	130
Figura 76. Análisis de la expresión de Cdk4, Cdk6, Cdk2 y ciclina D1 en células SK-Mel 103 parentales y resistentes	130
Figura 77. Análisis <i>in vivo</i> de la resistencia a vemurafenib de las células A375 Triple-miR	132
Figura 78. Análisis de la expresión de <i>TRPM3</i> , <i>PAX6</i> y del posible papel de <i>PAX6</i> en la regulación de la expresión de miR-204-5p en células A375-VR	132
Figura 79. Análisis del papel de STAT3 en la regulación de la expresión de miR-204-5p en células A375-VR	133
Figura 80. Análisis del potencial papel de MITF en la regulación de la expresión de miR-211-5p en células A375-VR	134
Figura 81. Análisis de la expresión de NUA1 e IGFBP5 en células A375-VR y en transductantes que sobreexpresan miR-204-5p y miR-211-5p	135
Figura 82. Análisis de la expresión de efrina-B2 en células A375-VR y en transductantes con sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p	136
Figura 83. Análisis de la expresión de CHOP en células A375-VR y en células con sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p	136
Figura 84. Modelo de resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en células de melanoma	151

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones moleculares frecuentes en melanoma	22
Tabla 2. Anticuerpos empleados	64
Tabla 3. siRNAs utilizados para el silenciamiento transitorio de diferentes proteínas	66
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qPCR	73

Tabla 5. Programa de PCR empleado en los ensayos de qPCR para el análisis de expresión de mRNAs	74
Tabla 6. Programa empleado en los ensayos de qPCR para el análisis de expresión de miRNAs	74
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de cDNA previa a la secuenciación	75
Tabla 8. Programa de PCR empleado para la amplificación de cDNA previa a la secuenciación	75
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación de cDNA por el método de Sanger	75

ABREVIATURAS

A

ADAM9	<i>Disintegrin And Metalloproteinase Domain-Containing Protein 9</i> , proteína con dominios metaloproteínasa y desintegrina 9
AGO	<i>Argonaute</i> , argonauta
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i> , quinasa del linfoma anaplásico
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por AMP
AP-1	<i>Activator protein 1</i> , proteína activadora 1
APC	<i>Antigen-presenting cells</i> , células presentadoras de antígenos
APE1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i> , endonucleasa apurínica/apirimidínica 1
ARAF	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1</i> , homólogo 1 del oncogén viral 3611 v-raf de sarcoma murino
ARID2	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 2</i> , proteína con dominio interactivo rico en AT 2
ARK5	<i>AMP-activated protein kinase family member 5</i> , miembro 5 de la familia de proteínas quinasa activadas por AMP
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adenosín trifosfato

B

Bad	<i>Bcl-2 associated agonist of cell death</i> , agonista de muerte celular asociado a Bcl-2
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i> , linfoma de células B 2
Bcl-xL	<i>Bcl-2-like protein 1 large isoform</i> , isoforma grande de proteína tipo Bcl-2 1
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i> , proteína tipo Bcl-2 11
BIX	BIX02189
Blk	<i>B lymphocyte kinase</i> , quinasa de linfocitos B
BMK1	<i>Big mitogen-activated protein kinase 1</i> , proteína quinasa de gran tamaño activada por mitógenos 1
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i> , homólogo B1 del oncogén viral v-raf de sarcoma murino
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino

C

CK2	<i>Casein kinase 2</i> , caseína quinasa 2
CCK-8	<i>Cell counting kit-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)</i> , kit de conteo celular (sal monosódica de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio)
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i> , ligando 2 de quimioquina con motivo C-C
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , grupo de diferenciación
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i> , proteína homóloga de control de división celular 42
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i> , quinasa dependiente de ciclina
CDKN	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> , inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , ADN complementario
CHOP	<i>C/EBP homologous protein 10</i> , proteína homóloga a C/EBP 10
Ciclohex	Cicloheximida
c-Mos	<i>Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog</i> , homólogo del oncogén viral de sarcoma murino de Moloney

c-Myc	<i>Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> , homólogo del oncogén viral de mielocitomatosis aviar
COT	<i>Cancer Osaka Thyroid</i> , cáncer Osaka de tiroides
CRAF	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> , homólogo 1 del oncogén viral v-raf de leucemia murina
CRD	<i>Cysteine-rich domain</i> , dominio rico en cisteínas
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> , elemento de respuesta a cAMP
c-Ret	<i>Rearranged during transfection</i> , reorganizado durante la transfección
CSD	<i>Chronically sun-damaged</i> , dañada de forma crónica por el sol
CSF-1R	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i> , receptor del factor estimulante de colonias 1
c-Src	<i>Avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i> , homólogo del oncogén viral del sarcoma aviar (Schmidt-Ruppin A-2)
Ct	<i>Cycle threshold</i> , ciclo umbral
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> , antígeno de linfocito T citotóxico 4
Ctrl	Control
CXCR	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i> , receptor de quimioquinas con motivo C-X-C

D

DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> , 4',6-diamidino-2-fenilindol
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i> , region crítica del síndrome DiGeorge 8
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> , dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico (ADN)
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i> , desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	<i>Dithiothreitol</i> , ditiotreitól
DUSP	<i>Dual-specificity phosphatase</i> , fosfatasa de especificidad dual

E

EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> , ácido etilendiaminotetraacético
EFNB2	<i>Ephrin B2</i> , efrina B2
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGR1	<i>Early growth response 1</i> , respuesta de crecimiento temprana 1
eIF4	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4</i> , factor de iniciación de la traducción eucariota 4
Elk1	<i>ETS-like transcription factor 1</i> , factor de transcripción tipo ETS 1
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agencia Europea de Medicamentos
EPHA2	<i>Ephrin receptor A2</i> , receptor de efrina A2
ER	<i>ERKi resistant</i> , resistente a ERKi
Erbin	<i>ErbB2 interacting protein</i> , proteína de interacción con ErbB2
ERKi	Inhibidor de ERK
ErbB	<i>Avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i> , homólogo del oncogén viral de leucemia eritroblástica aviar
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> , quinasa regulada por señales extracelulares
ERL	Erlotinib
ETS	<i>E26-AMV virus cellular homolog</i> , homólogo celular del virus E26-AMV

F

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU
FERMT2	<i>Fermitin family member 2</i> , miembro de la familia de fermitina 2
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
Fgr	<i>Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma felino Gardner-Rasheed
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína
FOXO	<i>Forkhead box protein O</i> , proteína forkhead box O
FRA1	<i>Fos-related antigen 1</i> , antígeno relacionado con Fos 1

G

Gab1	<i>Grb2-associated-binding protein 1</i> , proteína de unión asociada a Grb2 1
GADD153	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 153, proteína inducible por parada del crecimiento y daño en el DNA 153
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> , proteína activadora de GTPasa
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i> , guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> , factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GLI1	<i>Glioma-associated homolog 1</i> , homólogo asociado a glioma 1
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteínas G
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> , proteína de unión a receptor de factor de crecimiento 2
GST	<i>Glutathione S-transferase</i> , glutatión S-transferasa
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> , guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa

H

HA	<i>Hemagglutinin</i> , hemaglutinina
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> , factor de crecimiento de hepatocitos
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma de rata de Harvey
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano

I

IFN	<i>Interferon</i> , interferón
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , factor de crecimiento similar a insulina
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i> , receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i> , proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina
IgG	<i>Immunoglobulin G</i> , Inmunoglobulina G
IL	<i>Interleukin</i> , interleuquina

IMP	<i>Impedes mitogenic signal propagation</i> , impide propagación de señales mitogénicas
INPP4B	<i>Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II</i> , inositol polifosfato 4-fosfatasa tipo II
IR	<i>Insulin receptor</i> , receptor de insulina
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i> , sustrato del receptor de insulina 1
IQGAP1	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i> , proteína activadora de GTPasa con motivo IQ 1

J

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , quinasa N-terminal de c-Jun
-----	--

K

KIT	<i>Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma felino de Hardy-Zuckerman 4
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral homolog</i> , homólogo del virus de sarcoma de rata de Kirsten
KSR	<i>Kinase suppressor of Ras</i> , quinasa supresora de Ras

L

Lck	<i>Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase</i> , proteína tirosina quinasa específica de linfocitos
LKB1	<i>Liver kinase B1</i> , quinasa hepática B1
LPT	Lapatinib
LST	Linsitinib
LXR β	<i>Liver X receptor beta</i> , receptor X hepático beta
Lyn	<i>Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase</i> , nueva proteína tirosina quinasa relacionada con Lck/Yes

M

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por mitógenos
MAP2K	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> , proteína quinasa de quinasa activada por mitógenos
MAP3K	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> , proteína quinasa de quinasa de quinasa activada por mitógenos
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i> , leucemia de células mieloides-1
MDM	<i>Mouse double minute human homolog</i> , homólogo humano de dobles diminutos de ratón
MEF2C	<i>Myocyte enhancer factor 2C</i> , factor potenciador de miocitos 2C
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i> , quinasa de MAPK/ERK
MEKK1	<i>MAPK/ERK kinase kinase 1</i> , quinasa de quinasa de MAPK/ERK 1
miRISC	<i>miRNA-containing RNA induced silencing complex</i> , complejo de silenciamiento inducido por RNA asociado a miRNA
miRNA	microRNA
Mirsups	<i>Tumor suppressor miRNAs</i> , miRNAs supresores de tumores
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i> , factor de transcripción asociado a microftalmia
MKP3	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3</i> , fosfatasa de proteína quinasa activada por mitógenos 3
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i> , quinasa de la cadena ligera de la miosina

M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i> , virus de leucemia murina de Moloney
MNK	<i>MAPK interacting serine/threonine kinase</i> , serina/treonina quinasa de interacción con proteínas quinasa activadas por mitógenos
MRTF	<i>Myocardin related transcription factor</i> , factor de transcripción relacionado con miocardina
mTORC	<i>Mammalian target of rapamycin complex</i> , complejo diana de rapamicina en mamíferos
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> , bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,3-difeniltetrazol

N

NEDD9	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9</i> , proteína disminuida en el desarrollo de células precursoras neurales 9
NF1	<i>Neurofibromin 1</i> , neurofibromina 1
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> , factor nuclear de células T activadas
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas
NGF	<i>Nerve growth factor</i> , factor de crecimiento nervioso
NK	<i>Natural killer</i>
No-CSD	<i>Non-chronically sun-damaged</i> , no dañada de forma crónica por el sol
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral homolog</i> , homólogo de RAS viral de neuroblastoma
NRG1	<i>Neuregulin 1</i> , neuregulina 1
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ (NOD scid gamma)

O

<i>Oncomirs</i>	<i>Oncogenic miRNAs</i> , miRNAs oncogénicos
-----------------	--

P

p	<i>p-value</i> , p-valor
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en gel de poliacrilamida
PAK	<i>p21 activated kinase</i> , quinasa activada por p21
Palbo	Palbociclib
Par	Parentales
PAX6	<i>Paired box 6</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i> , muerte celular programada-1
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand-1</i> , ligando de muerte celular programada-1
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKD1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i> , proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos 1
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> , coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
PH	<i>Pleckstrin homology domain</i> , dominio de homología a pleckstrina

PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i> , quinasa de retículo endoplasmático similar a la proteína quinasa dependiente de ARN
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> , fosfatidilinositol 3-quinasa
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol- 4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> , subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PIK3CG	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma</i> , subunidad catalítica gamma de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i> , proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i> , proteína de la leucemia promielocítica
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i> , proteína fosfatasa 1
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i> , proteína fosfatasa 2A
PPP6	<i>Protein phosphatase 6</i> , proteína fosfatasa 6
P-Rex	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor</i> , factor intercambiador de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding domain</i> , dominio de unión a fosfotirosinas
PtdIns(4,5)P ₂	<i>Phosphatidylinositol- 4,5-biphosphate</i> , fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PtdIns(3,4,5)P ₃	<i>Phosphatidylinositol- 3,4,5-triphosphate</i> , fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> , homólogo de fosfatasa y tensina
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> , difluoruro de polivinilideno

Q

qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
------	--

R

Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> , sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , fibrosarcoma rápidamente acelerado
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i> , proteína nuclear relacionada con Ras
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i> , proteína reguladora asociada a mTOR
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , sarcoma de rata
RB	<i>Retinoblastoma-associated protein</i> , proteína asociada a retinoblastoma
RBD	<i>Ras-binding domain</i> , dominio de unión a Ras
RE	Retículo endoplásmico
Rho	<i>Ras homolog family</i> , familia homóloga a Ras
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico (ARN)
RNasa	Ribonucleasa
RNAseq	Secuenciación de RNA
RNU44	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 44</i> , RNA nucleolar pequeño C/D box 44
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i> , proteína quinasa asociada a Rho
RSK	<i>90 kDa ribosomal protein S6 kinase</i> , quinasa de 90 kDa de la proteína ribosomal S6
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> , receptor tirosina quinasa
RYK	<i>Receptor like tyrosine kinase</i> , tirosina quinasa similar a receptor

S

S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i> , esfingosina-1-fosfato
-----	--

S6K	<i>70 kDa ribosomal protein S6 kinase</i> , quinasa de 70 kDa de la proteína ribosomal S6
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por estrés
SCH	SCH772984
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato sódico
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , error estándar de la media
SFK	<i>Src family kinase</i> , quinasa de la familia Src
sFRP2	<i>Secreted frizzled related protein 2</i> , proteína secretada relacionada con frizzled 2
SH2	<i>Src homology 2 domain</i> , dominio homólogo a Src 2
Shc	<i>SH2 domain protein C</i> , proteína C con dominio SH2
SHIP	<i>SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase</i> , inositol 5'-fosfatasa con dominio SH2
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> , RNA pequeño de interferencia
Shh	<i>Sonic hedgehog homolog</i> , homólogo de Sonic hedgehog
Sob	Sobrenadante
SOS	<i>Son of sevenless homolog</i> , homólogo de son of sevenless
SOX10	<i>SRY-box transcription factor 10</i> , factor de transcripción SRY-box 10
SPRED1	<i>Sprouty related EVH1 domain containing protein 1</i> , proteína con dominio EVH1 relacionada con Sprouty 1
Spry	Sprouty
Src	<i>Sarcoma tyrosine kinase</i> , tirosina quinasa de sarcoma
SRCT	Saracatinib
SRF	<i>Serum response factor</i> , factor de respuesta a suero
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> , transductor de señales y activador de la transcripción 3
SWI/SNF	<i>Switch/sucrose non-fermentable</i> , intercambio/sacarosa no fermentable

T

TBP	<i>TATA-box-binding protein</i> , proteína de unión a TATA box
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , solución salina tamponada con Tris
TCB	Triciribina
<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase, transcriptasa reversa de la telomerasa
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , factor de crecimiento transformador
Thg	<i>Thapsigargin</i> , tapsigargina
Tiam1	<i>T cell lymphoma invasion and metastasis 1</i> , metástasis e invasión de linfoma de células T 1
TIF1A	<i>Transcription intermediary factor 1-alpha</i> , factor de transcripción intermediario 1 alfa
TMT	Trametinib
TNN	Tampón de lisis Tris-HCl (50 nM, pH 7.4), NaCl (150 mM), Nonidet P-40 (0.5%)
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i> , proteína tumoral p53
Tpl-2	<i>Tumor progression locus 2</i> , locus de progresión tumoral 2
TR	<i>Trametinib resistant</i> , resistente a trametinib
TRBP	<i>Trans-activation responsive RNA-binding protein</i> , proteína de unión a RNA de respuesta a trans-activación
Tris	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> , tris(hidroximetil)aminometano
TRPM	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M</i> , subfamilia M de canales catiónicos receptores de potencial transitorio
TSC	<i>Tuberous sclerosis protein</i> , proteína de esclerosis tuberosa
T-VEC	Talimogene laherparepvec
TYR	<i>Tyrosinase</i> , tirosinasa

TZM Trastuzumab

U

UTR *Untranslated region*, región no traducida

UV Ultravioleta

V

VEGF *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR *Vascular endothelial growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

VMF vemurafenib

VR *Vemurafenib-resistant*, resistente a vemurafenib

VR/ER *Vemurafenib and ERK inhibitor resistant*, resistente a vemurafenib y al inhibidor de ERK

VR/TR *Vemurafenib and trametinib resistant*, resistente a vemurafenib y a trametinib

W

Wnt *Wingless-type MMTV integration site family*, familia del sitio de integración de MMTV tipo wingless

WT *Wild type*, Silvestre

Y

YAP *Yes-associated protein*, proteína asociada a Yes

Yes *Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog*, homólogo del oncogén viral del sarcoma Yamaguchi

SUMMARY

INTRODUCTION

Melanoma is a malignant neoplasm derived from melanocytes which is mostly associated to mutations that activate the MAPK/ERK signaling pathway and drive tumor cell proliferation. The most frequent genetic alteration in melanoma is the *BRAF* mutation, especially BRAF^{V600E}, which is present in almost 90% of the patients harboring *BRAF* mutations. Melanoma treatment with BRAF^{V600E}-specific inhibitors, such as vemurafenib and dabrafenib, and in particular, combinations of these with MEK inhibitors including trametinib, increases response rates and survival of melanoma patients, as compared with conventional chemotherapy. Nevertheless, MAPK/ERK pathway reactivation considerably reduces treatment effectiveness and leads to resistance, which has prompted the development of ERK inhibitors to achieve a greater suppression of this signaling route. However, the experience with BRAF and MEK inhibitors suggests that acquisition of resistance to ERK inhibitors is likely to appear. On the other hand, several studies have shown that response to targeted therapies can be limited by non-genomic alterations, and previous results from our laboratory pointed out the contribution of miR-204-5p and miR-211-5p to vemurafenib resistance in melanoma cells.

OBJECTIVES

- Generation and characterization of melanoma cell lines single resistant to the ERK inhibitor SCH772984, and double resistant to vemurafenib and trametinib or vemurafenib and SCH772984.
- Identification of molecular alterations in signaling pathways in resistant cells and determination of their involvement in resistance.
- Analysis of the regulation of miR-204-5p and miR-211-5p expression in vemurafenib-resistant melanoma cells, and identification of their protein targets.

RESULTS

For the generation of resistant cells, we used the A375 and SK-Mel 28 human melanoma cell lines harboring the BRAF^{V600E} mutation, and the N-Ras^{Q61R} mutated SK-Mel 103 cell line. A375 and SK-Mel 28 cells resistant to SCH772984 or to vemurafenib/trametinib or vemurafenib/SCH772984 showed lower Erk1/2 phosphorylation levels than parental cells. Moreover, these resistant cells displayed increased activation of the PI3K-Akt route, although this activation did not substantially contribute to resistant cell viability. Our data indicate that inhibition of the MAPK/ERK pathway is compensated by an increase in MEK5-Erk5 pathway activation in resistant cells, leading to cell survival and proliferation. On the contrary, SK-Mel 103 cells resistant to SCH772984 maintained high Erk1/2 phosphorylation in the presence of the inhibitor and did not increase Erk5 activation. Analysis of upstream events from MEK5-Erk5 activation revealed that Erk5 phosphorylation is IGF-1R-dependent, and of note, expression and activation of this receptor is increased in resistant cells. Augmented IGF-1R levels in resistant cells are driven, at least in part, by higher IGF-1R protein stability. IGF-1R inhibition reduced Erk5 activation and 3D growth of resistant cell-derived spheroids, as well as diminished tumor growth of these cells in mice. We have also observed a significant increase in IGFBP5 expression in resistant cells, which contributes

to IGF-1R activation. Preliminary results suggest that upregulated IGFBP5 expression occurs early during vemurafenib plus trametinib *in vivo* treatment.

On the other hand, comparative analysis of growth factor expression revealed a reduction of TGF- α levels in resistant cells compared to their parental counterparts, and we observed a direct correlation between MAPK/ERK pathway activation and *TGFA* expression. Furthermore, our data show that exposure of resistant cells to TGF- α or to conditioned media from parental cells rescues Erk1/2 phosphorylation, which is possibly facilitated by the high EGFR expression levels in resistant cells. Our data suggest the possibility that reduced TGF- α expression in resistant cells could represent a mechanism contributing to their diminished Erk1/2 activation.

For the third objective, we used A375 cells resistant to vemurafenib and A375 cells overexpressing miR-204-5p and/or miR-211-5p, previously generated in our laboratory. Overexpression of miR-204-5p and miR-211-5p increased *in vivo* A375 tumor growth in the presence of vemurafenib. Analysis of the regulation of miR-204-5p and miR-211-5p expression showed that the STAT3 transcription factor contributes to miR-204-5p upregulation in vemurafenib-resistant A375 cells, whereas miR-211-5p expression was found to be MITF-independent. Finally, we show that increased miR-211-5p expression in the resistant cells correlates with diminished levels of its targets NUA1 and CHOP.

CONCLUSIONS

Resistance to MAPK/ERK pathway inhibitors is mediated by activation of the IGF-1R-MEK5-Erk5 route, which enables melanoma cell survival despite low Erk1/2 activation. Reduced TGF- α expression contributes to maintaining Erk1/2 inhibition in resistant cells. Our results suggest that inhibition of the IGF-1R-MEK5-Erk5 pathway may constitute a potential therapeutic strategy in melanoma.

We also show that STAT3 induces miR-204-5p expression in vemurafenib-resistant A375 cells, and we have identified NUA1 and CHOP as miR-211-5p targets in these resistant cells. Their reduced expression might facilitate resistance to vemurafenib.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El melanoma es un tumor maligno de melanocitos asociado mayoritariamente a mutaciones que causan la activación de la vía de señalización MAPK/ERK, las cuales promueven la proliferación de las células tumorales. De estas alteraciones genéticas, la más frecuente en melanoma es la mutación en *BRAF*, y especialmente *BRAF*^{V600E}, la cual está presente en casi el 90% de los pacientes con *BRAF* mutado. El tratamiento con inhibidores específicos de *BRAF*^{V600E} como el vemurafenib y dabrafenib, y en particular, la combinación de éstos con inhibidores de MEK como el trametinib, ha permitido incrementar la tasa de respuesta y la supervivencia de los pacientes en comparación con la quimioterapia convencional. Sin embargo, la reactivación de la vía MAPK/ERK como consecuencia de estos tratamientos reduce considerablemente la eficacia de estos inhibidores y da lugar a resistencia, lo cual ha llevado al desarrollo de inhibidores de ERK que permitan una mayor supresión de la activación de esta vía. No obstante, la experiencia con los inhibidores de *BRAF* y MEK sugiere que el desarrollo de mecanismos de resistencia a los inhibidores de ERK es esperable. Por otra parte, varios estudios muestran que la respuesta a estas terapias dirigidas puede estar limitada por alteraciones no genómicas, y resultados previos del laboratorio indican la contribución de los microRNAs miR-204-5p y miR-211-5p a la resistencia a vemurafenib en células de melanoma.

OBJETIVOS

- Generación y caracterización de líneas celulares de melanoma con resistencia simple al inhibidor de ERK SCH772984, y con resistencia doble a vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH772984.
- Identificación de alteraciones en rutas de señalización en las células resistentes, y determinación de su implicación en las resistencias.
- Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib, e identificación de sus dianas proteicas.

RESULTADOS

Para la generación de las células resistentes, se emplearon las líneas celulares de melanoma humano A375 y SK-Mel 28, las cuales presentan la mutación *BRAF*^{V600E}, y la línea SK-Mel 103 con la mutación N-Ras^{Q61R}. Las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH772984 o a las combinaciones de vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH mostraron menores niveles de fosforilación de Erk1/2 que las células parentales. Asimismo, dichas células resistentes presentaron un aumento de la activación de la ruta PI3K/Akt, aunque nuestros datos indican que ésta no contribuye sustancialmente a la viabilidad de las células resistentes. Nuestros resultados muestran que la inhibición de la vía MAPK/ERK en las células resistentes está compensada por un incremento en la activación de la ruta MEK5-Erk5, permitiendo su supervivencia y proliferación. Por el contrario, las células SK-Mel 103 resistentes a SCH772984 mantuvieron la fosforilación de Erk1/2 en presencia del inhibidor y no incrementaron la activación de Erk5. Análisis de los eventos *upstream* de la activación de la vía MEK5-Erk5 revelaron que la fosforilación de Erk5 en las células A375 y SK-Mel 28 resistentes es dependiente del receptor tirosina quinasa IGF-1R, cuya expresión y activación se encuentra aumentada en estas células. Este incremento de los niveles de IGF-1R está causado, al menos en parte, por el aumento de la

estabilidad de IGF-1R en las células resistentes. De esta manera, mostramos que la inhibición de IGF-1R reduce la activación de Erk5 y disminuye el crecimiento 3D de esferoides de células resistentes, así como el crecimiento en ratones de tumores derivados de dichas células. Hemos observado asimismo que la expresión de IGFBP5 se encuentra significativamente incrementada en las células resistentes y contribuye a la activación de IGF-1R. Los resultados sugieren que el aumento de IGFBP5 ocurre en tumores de células A375 de forma temprana durante el tratamiento *in vivo* con vemurafenib y trametinib.

Por otra parte, el análisis comparativo de la expresión de factores de crecimiento reveló una menor expresión de TGF- α en las células resistentes que en las parentales, y observamos una correlación directa entre el grado de activación de la vía MAPK/ERK y la expresión de este factor. Más aún, nuestros resultados han mostrado que la incubación de las células resistentes con TGF- α o con medio condicionado por las células parentales permite la recuperación de la fosforilación de Erk1/2 en las células resistentes, posiblemente facilitada por el aumento de expresión de EGFR en dichas células. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la reducción de la expresión de TGF- α en las células resistentes pudiera representar un mecanismo que contribuya a la disminución de la activación de Erk1/2 en estas células.

Para el tercer objetivo se utilizaron células A375 resistentes a vemurafenib y células A375 que sobreexpresaban miR-204-5p y/o miR-211-5p, generadas con anterioridad en el laboratorio. La sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p se tradujo en un aumento del crecimiento *in vivo* de tumores de células A375 en presencia de vemurafenib. El análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p reveló que el factor de transcripción STAT3 contribuye al incremento de expresión de miR-204-5p en las células A375 resistentes a vemurafenib, mientras que la expresión de miR-211-5p parece ser independiente de MITF en estas células. Finalmente, mostramos que el aumento de miR-211-5p se correlaciona con la disminución de los niveles de sus dianas NUA1 y CHOP.

CONCLUSIONES

La resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK está mediada por la activación de la ruta IGF-1R-MEK5-Erk5, la cual permite la supervivencia en presencia de baja activación de Erk1/2 en células de melanoma. La disminución de la expresión de TGF- α contribuye al mantenimiento de la inhibición de Erk1/2 en células resistentes. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de IGF-1R-MEK5-Erk5 constituye una estrategia terapéutica potencial en melanoma.

Por otra parte, hemos mostrado que STAT3 induce la expresión de miR-204-5p en células A375 resistentes a vemurafenib, e identificado NUA1 y CHOP como dianas de miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib, las cuales podrían mediar dicha resistencia.

INTRODUCCIÓN

1. El melanoma

El melanoma es un tumor maligno de melanocitos, los cuales son células derivadas de la cresta neural que durante el desarrollo colonizan principalmente la piel, pero también el ojo y tejidos internos. El melanoma se clasifica en diferentes subtipos en función del tejido a partir del cual se origina el tumor primario. El más frecuente es el melanoma cutáneo, que se forma a partir de los melanocitos presentes en la epidermis, y es responsable de cerca del 80% de las muertes relacionadas con cáncer de piel (Schadendorf *et al.*, 2015). Otros subtipos menos comunes son el melanoma acral, formado en la piel glabra de pies y manos; el mucosal, que surge a partir de melanocitos en la mucosa de tejidos internos; y el uveal, que se desarrolla en el tracto uveal del ojo. Estos cuatro subtipos de melanoma no solo difieren en su localización anatómica, sino también en sus características clínicas, histopatológicas y genéticas.

En la piel, los melanocitos constituyen una población celular minoritaria localizada en la epidermis basal, y su principal función es proporcionar melanina a los queratinocitos cercanos. Dicha función está regulada por los mismos queratinocitos de la epidermis, que en respuesta al daño en el DNA inducido por la radiación ultravioleta, secretan factores que inducen la proliferación de melanocitos y la producción de melanina (Cui *et al.*, 2007). Puesto que la melanina es una macromolécula que absorbe radiación ultravioleta, los melanocitos constituyen un sistema de defensa clave frente al daño en el DNA causado por esta radiación (Shain y Bastian, 2016).

La exposición a radiación ultravioleta está considerada como un importante factor de riesgo para el desarrollo del melanoma cutáneo, el cual presenta una alta carga de mutaciones somáticas, en comparación con otros tipos de cáncer (Lawrence *et al.*, 2014). Así, los melanomas cutáneos contienen una media de 13-17 mutaciones por Mbp de DNA, siendo esta tasa de mutación particularmente elevada en tumores presentes en piel expuesta al sol de forma crónica (Akbari *et al.*, 2015; Rajkumar y Watson, 2016). Además, aproximadamente el 45% de las mutaciones en melanoma son transiciones de citosina a timina, y el 10% son transversiones de guanina a timina, las cuales son mutaciones causadas por la radiación UV-B (Hodis *et al.*, 2012). Sin embargo, solo unas pocas alteraciones genéticas son las responsables de promover la progresión tumoral (denominadas mutaciones *driver*), mientras que la mayoría no confieren ventajas para el crecimiento del tumor (mutaciones *passenger*). En los últimos años, se han llevado a cabo estudios genómicos a gran escala para identificar las mutaciones más relevantes en pacientes con melanoma (Hodis *et al.*, 2012; Akbari *et al.*, 2015; Hayward *et al.*, 2017) (Tabla 1).

Vías de señalización o procesos biológicos	Genes alterados
MAP quinasas	<i>BRAF</i>
	<i>NRAS</i>
	<i>NF1</i>
PI3-quinasa/Akt	<i>PTEN</i>
	<i>AKT3</i>
Ciclo celular	<i>CDKN2A</i>
	<i>TP53</i>
Receptores tirosina quinasa	<i>KIT</i>
Mantenimiento de telómeros	<i>TERT</i>
GTPasa Rac	<i>RAC1</i>
	<i>PREX2</i>
Remodelación de la cromatina	<i>ARID2</i>
Linaje melanocítico	<i>MITF</i>

Tabla 1. Alteraciones moleculares frecuentes en melanoma. Principales vías de señalización y procesos biológicos implicados en la progresión del melanoma y algunos de los genes frecuentemente alterados.

1.1. Mutaciones en melanoma

Más del 80% de los melanomas cutáneos presentan mutaciones *driver* que causan la activación constitutiva de la vía de las MAP quinasas (MAPK/ERK), la cual regula especialmente la proliferación celular (Pandiani *et al.*, 2017). Se ha propuesto una clasificación en cuatro subtipos genéticos de melanoma en función de la mutación responsable de la activación de esta vía: melanomas con mutación en *BRAF*, en *RAS*, en *NF1* o bien triple *wild type* (WT) (Rajkumar y Watson, 2016; Hayward *et al.*, 2017; Akbani *et al.*, 2015). Las alteraciones genéticas más frecuentes en melanoma son las mutaciones en *BRAF*, ya que están presentes en aproximadamente el 60% de los tumores (Davies *et al.*, 2002). De estas mutaciones, la más común (hasta el 80-90% de los casos) es la sustitución de una valina por un ácido glutámico (V600E) en el exón 15, la cual da lugar a la activación constitutiva de la proteína quinasa BRAF (Hocker y Tsao, 2007; Davies *et al.*, 2002). Otras mutaciones activadoras de *BRAF* son la sustitución de valina por lisina (V600K) y de valina por arginina (V600R) (Hodis *et al.*, 2012). La segunda mutación más frecuente en melanoma ocurre en *NRAS* (entre el 15-30% de los tumores), y suele afectar a la glutamina en la posición 61 (Q61K, Q61L y Q61R), o bien a la glicina 12 (G12D, G12S) o la glicina 13 (G13D, G13R, G13V). Estas alteraciones genéticas impiden la hidrólisis de GTP causando la activación permanente de N-Ras, y se han asociado con un incremento de la agresividad de los tumores y una baja supervivencia de los pacientes (Devitt *et al.*, 2011). No obstante, hay estudios que indican una peor prognosis de los melanomas con mutación en *BRAF* (Long *et al.*, 2011; Mar *et al.*, 2015), mientras que otros análisis no han hallado asociaciones entre las mutaciones en *BRAF* o *NRAS* y supervivencia (Carlino, Haydu *et al.*, 2014). A diferencia de lo que ocurre en otros tipos de tumores, las mutaciones en *HRAS* y

KRAS son muy poco comunes en melanoma, estando solo presentes en alrededor del 1% de los casos (Akbari *et al.*, 2015). *NF1* actúa como una proteína Ras-GAP (*GTPase-activating protein*), es decir, como un regulador negativo de Ras, y se han identificado mutaciones inactivadoras en aproximadamente el 10-15% de los melanomas (Krauthammer *et al.*, 2015; Shain *et al.*, 2015). Las alteraciones en *NF1* se asocian principalmente a melanomas causados por daño crónico por el sol en pacientes de edad avanzada (Krauthammer *et al.*, 2015). En cuanto a los melanomas triple WT, presentan mayor recurrencia de mutaciones activadoras o amplificaciones de los receptores tirosina quinasa *KIT*, *PDGFRA* y *VEGFR2* (Akbari *et al.*, 2015; Rajkumar y Watson, 2016). Las alteraciones genéticas en *KIT* son también más frecuentes en melanomas causados por daño crónico por el sol (Curtin *et al.*, 2006). Asimismo, se han identificado mutaciones de ganancia de función en *MEK1* (*MAP2K1*) y *MEK2* (*MAP2K2*) (Nikolaev *et al.*, 2012).

A pesar de la prevalencia de las alteraciones que activan la vía MAPK/ERK, éstas no son suficientes para causar neoplasias malignas, por lo que es necesario que se produzcan mutaciones o cambios epigenéticos adicionales. De esta manera, alrededor del 50% de los melanomas también presentan mutaciones que afectan a la vía de PI3-quinasa (PI3K)/Akt, la cual constituye una importante vía de señalización para la supervivencia celular (Pandiani *et al.*, 2017). El supresor tumoral *PTEN* codifica una fosfatasa lipídica que desfosforila el fosfatidil-inositol trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃), antagonizando la activación de la quinasa Akt. La disminución de la expresión de *PTEN*, ya sea por mutaciones puntuales o por delección de un alelo, ha sido detectada en el 10-30% de melanomas avanzados, siendo más prevalente en melanomas invasivos y metastásicos que en las etapas iniciales (Akbari *et al.*, 2015). Las alteraciones en *PTEN* suelen coexistir con mutaciones en *BRAF*, pero no con mutaciones en *NRAS* o *NF1*, ya que éstas pueden activar de forma independiente la vía de señalización PI3K/Akt (Tsao *et al.*, 2004). Aparte de la inactivación de *PTEN*, se han identificado mutaciones de ganancia de función o amplificaciones en *PIK3CA* (Shull *et al.*, 2012; Akbari *et al.*, 2015), la cual codifica la subunidad catalítica de PI3K, o en *AKT3* (Davies *et al.*, 2008).

Otras mutaciones en melanoma pueden afectar a proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. La alteración genética más importante de este tipo es la mutación o pérdida de expresión de *CDKN2A*, puesto que se encuentra en el 70% de los melanomas esporádicos y en el 30-40% de los pacientes con melanoma familiar (Liu *et al.*, 1999; Curtin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016). *CDKN2A* codifica la proteína p16^{INK4a}, cuya función es la inhibición de las quinasas Cdk4 y Cdk6 implicadas en la transición entre las fases G₁ y S del ciclo celular. Adicionalmente, algunos casos de melanoma familiar se han asociado a la mutación o a la amplificación de *CDK4* (Zuo *et al.*, 1996; Paluncic *et al.*, 2016). Aunque con menor frecuencia que en otros tipos de cáncer, se han identificado mutaciones en *TP53* (Hodis *et al.*, 2012; Shtivelman *et al.*, 2014), la amplificación de *MDM4* (Gembarska *et al.*, 2012), la sobreexpresión de *MDM2* (Wade *et al.*, 2013) o la amplificación conjunta de *CDK4* y *MDM2* (Muthusamy *et al.*, 2006).

Asimismo, las mutaciones activadoras en el promotor de *TERT*, que codifica para la transcriptasa reversa telomerasa (TERT), la cual es responsable del mantenimiento de los telómeros, están presentes en el 33% de los melanomas primarios y en el 85% de los melanomas metastásicos (Horn *et al.*, 2013). Las alteraciones en *TERT* están asociadas a mutaciones en *BRAF* o *NRAS*, y constituyen un factor de mala prognosis en melanoma

(Griewank *et al.*, 2014). Por otra parte, el factor de transcripción asociado a microftalmia (*MITF*) es fundamental para la diferenciación de los melanocitos, y la amplificación génica de *MITF* ha sido observada hasta en el 20% de los melanomas metastásicos (Garraway *et al.*, 2005), lo cual indica que puede tener un papel oncogénico en el desarrollo del melanoma.

En estudios de secuenciación de exomas se han identificado otras mutaciones recurrentes, como por ejemplo en *RAC1* (P29S), lo que se traduce en un aumento de su actividad GTPasa (Krauthammer *et al.*, 2012; Vu *et al.*, 2015), y en *PREX2*, un factor GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) que regula positivamente a Rac y que, además, actúa como inhibidor de PTEN (Berger *et al.*, 2012; Akbani *et al.*, 2015). También se han descrito mutaciones en el supresor tumoral *ARID2*, el cual codifica para un componente del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (Hodis *et al.*, 2012).

El perfil de mutaciones presentes en melanoma cutáneo puede variar dependiendo de si derivan de piel dañada o no dañada de forma crónica por el sol, lo que ha llevado a la clasificación en dos subtipos de melanoma denominados CSD (*chronically sun-damaged*) o no-CSD (*non-chronically sun-damaged*), respectivamente (Shain y Bastian, 2016). Los melanomas CSD presentan un elevado número de mutaciones que son consecuencia de una mayor exposición a radiación UV, y suelen afectar a *NF1*, *KIT*, *NRAS* o *BRAF*, no incluyendo la alteración *BRAF*^{V600E}. Por el contrario, los melanomas no-CSD muestran menos mutaciones que los CSD, siendo *BRAF*^{V600E} la mutación más predominante (Curtin *et al.*, 2005; Bastian, 2014; Shain y Bastian, 2016).

1.2. Progresión del melanoma

Los melanomas avanzados presentan numerosas alteraciones genéticas. No obstante, el orden en el que ocurren las diferentes alteraciones moleculares durante la progresión del melanoma no se conoce todavía con exactitud. Además, como ya se ha mencionado, existen diferentes tipos de melanomas y su evolución puede seguir trayectorias distintas (Shain y Bastian, 2016; Shain *et al.*, 2018).

En algunos casos (alrededor del 30%), los melanomas cutáneos se encuentran histológicamente asociados a un nevus melanocítico (Lin, Luo *et al.*, 2015; Martín-Gorgojo y Nagore, 2018), lo que ha llevado a proponer que los melanomas podrían originarse a partir de nevi en dichos casos (Damsky y Bosenberg, 2017) (**Figura 1**). Los nevi comunes constituyen neoplasmas benignos que presentan frecuentemente la mutación *BRAF*^{V600E}, lo que induce proliferación celular (Poynter *et al.*, 2006). Sin embargo, la proliferación de los melanocitos en un nevus es limitada debido a la entrada de estas células en un estado de senescencia (Michaloglou *et al.*, 2005), la cual actúa como un mecanismo de supresión tumoral (Muñoz-Espín y Serrano, 2014). Las neoplasias melanocíticas benignas que presentan características histológicas de nevi común y de melanoma son denominadas neoplasmas intermedios, entre los que se incluyen los nevi displásicos (**Figura 1**). Este tipo de nevus presenta con mayor frecuencia mutaciones en *NRAS* o mutaciones en *BRAF* diferentes a V600E (Shain *et al.*, 2015), sugiriendo un posible origen diferente al nevi común. Los neoplasmas intermedios, además de la activación de la vía MAPK/ERK, pueden presentar mutaciones adicionales en el promotor de *TERT* y alteraciones en un alelo de *CDKN2A* (Shain *et al.*, 2015; Shain *et al.*, 2018). Las mutaciones en el promotor de *TERT*

activan la expresión de la telomerasa, permitiendo así el mantenimiento de los telómeros en las sucesivas divisiones celulares y la “inmortalidad” de los melanocitos (Artandi y DePinho, 2010; Horn *et al.*, 2013; Huang, Hodis *et al.*, 2013). Por su parte, la disminución de la expresión de p16^{INK4a}, debida a la pérdida de un alelo de *CDKN2A*, puede contribuir a superar el estado de senescencia y favorecer la entrada en el ciclo celular (Mackenzie Ross *et al.*, 2013).

Los melanomas *in situ* presentan alteraciones genéticas adicionales en comparación con los nevi, las cuales incrementan la capacidad proliferativa de los melanocitos, lo que se traduce en el crecimiento de un tumor en la epidermis (**Figura 1**). En esta fase de la progresión del melanoma, se han identificado mutaciones inactivadoras en componentes del complejo SWI/SNF, como por ejemplo en *ARID2* (Shain *et al.*, 2018), así como la pérdida de expresión de *NF1* (Shain *et al.*, 2015). El melanoma *in situ* puede iniciar un crecimiento vertical hacia la dermis, originando un melanoma invasivo (**Figura 1**). A diferencia de otros neoplasmas en los epitelios, la sola presencia de melanocitos transformados en la dermis no se correlaciona con la malignidad del tumor, sino que es la profundidad de la invasión la que indica el riesgo de enfermedad metastásica (Balch *et al.*, 2009). En melanomas invasivos, se ha descrito la inactivación de ambos alelos de *CDKN2A*, y en consecuencia la pérdida completa de p16^{INK4a}, así como otras alteraciones en genes implicados en el control de la transición G₁-S del ciclo celular (*CDK4*, *RB1*, *CCND1*, *PPP6*) (Shain *et al.*, 2015; Shain *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2018). Por tanto, la desregulación del ciclo celular es clave para la progresión del melanoma *in situ* a melanoma invasivo. Finalmente, en los estadios más avanzados del melanoma invasivo, se producen mutaciones que activan la vía PI3K/Akt y favorecen la supervivencia de las células tumorales, como son la pérdida de expresión de PTEN o la mutación de *PIK3CA* (Birck *et al.*, 2000; Shain *et al.*, 2018). Además, la pérdida de PTEN se correlaciona con la profundidad de la invasión y el riesgo de metástasis (Whiteman *et al.*, 2002; Dankort *et al.*, 2009). En esta fase invasiva se han descrito asimismo alteraciones en la ruta de p53, como mutaciones en *TP53* o la sobreexpresión de *MDM4*, que permiten la evasión de apoptosis (Hodis *et al.*, 2012; Shain *et al.*, 2018). Puesto que las mutaciones en *PTEN* y *TP53* ocurren de forma tardía en la progresión del melanoma, se ha propuesto que estas alteraciones no confieren ventaja selectiva a menos que haya otras vías de señalización simultáneamente afectadas (Lübbe *et al.*, 1994; Goel *et al.*, 2006; Shain *et al.*, 2018).

Aunque este modelo de progresión de melanoma *in situ* a invasivo es habitual para la mayoría de melanomas cutáneos, algunos melanomas invasivos pueden formarse sin una lesión precursora aparente, como es el caso del melanoma nodular. Se ha propuesto que este tipo de melanoma se originaría a partir de un melanocito que ya presenta mutaciones en moléculas reguladoras del ciclo celular o en PI3K/Akt, de manera que la posterior adquisición de mutaciones *driver* en la vía MAPK/ERK daría lugar a la formación del tumor maligno (Shain y Bastian, 2016).

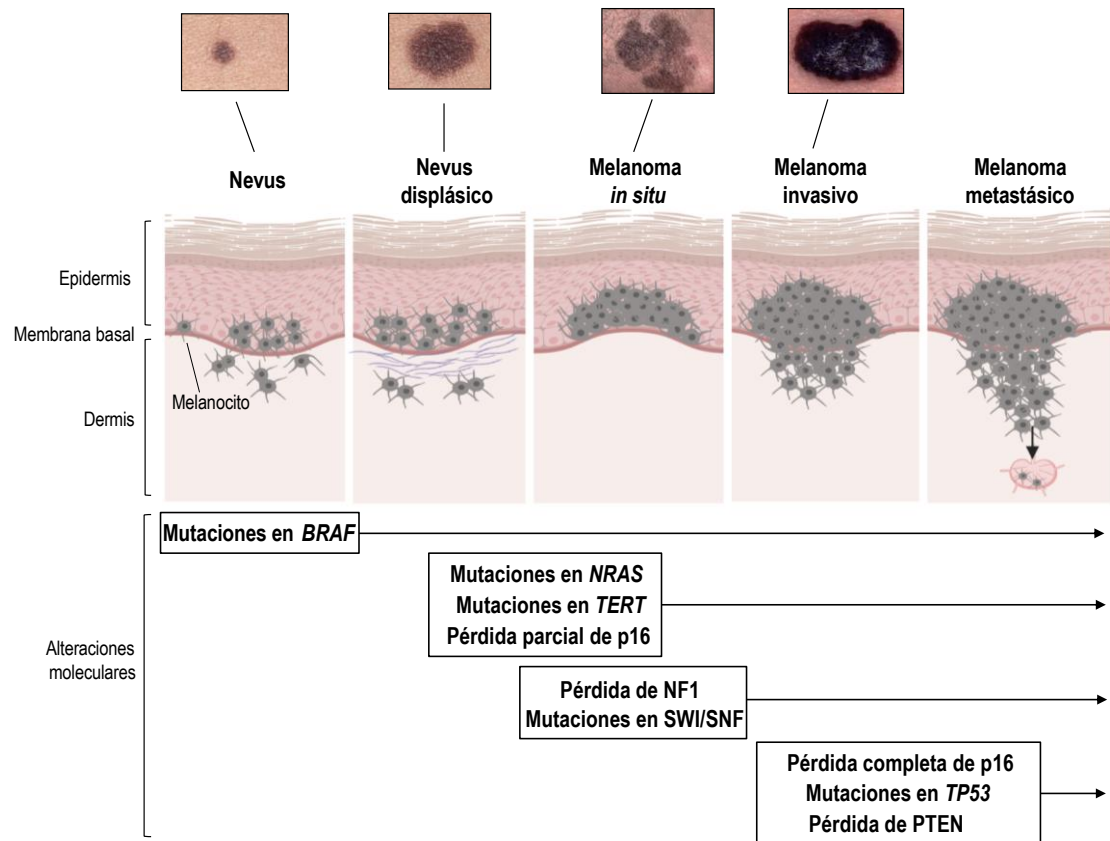


Figura 1. Progresión del melanoma cutáneo. Se muestran las alteraciones moleculares más frecuentes en cada estadio, en base a los estudios realizados en muestras de nevi y melanomas humanos. El esquema no implica que todos los melanomas se originen a partir de nevi. (Fotografías de las lesiones cutáneas obtenidas de Shain y Bastian, 2016).

En estadios avanzados del melanoma, las células tumorales pueden diseminarse a partir del tumor primario y colonizar otros tejidos, dando lugar a metástasis (**Figura 1**). Como ocurre en otros tipos de cáncer, las metástasis generalmente aparecen primero en los ganglios linfáticos próximos al tumor primario, y posteriormente se extienden a órganos distantes, principalmente a pulmones, hígado o cerebro. Para ello es necesario que las células reorganicen su citoesqueleto y su morfología, y se produzcan cambios en sus contactos con la matriz extracelular. Aunque los estudios de secuenciación de RNA y DNA en muestras de pacientes no han identificado mutaciones recurrentes que se asocian de forma específica a la transición de melanoma primario a metastásico (Sanborn *et al.*, 2015; Shain *et al.*, 2018), se han caracterizado diferentes mecanismos moleculares que pueden estar implicados en metástasis. Así, se ha descrito la implicación de NEDD9, una proteína adaptadora que controla adhesión, migración e invasión (Kim *et al.*, 2006), y del receptor de quimioquinas CXCR4 (Murakami *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2009) en modelos *xenograft* de metástasis en ratón. En modelos genéticos de melanoma murino, se ha demostrado que la pérdida de expresión de Pten coopera con la mutación en *Braf*^{V600E} o con la activación de Ras en la formación de melanoma metastásico (Dankort *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010). Asimismo, la activación de la señalización de Wnt y β -catenina induce metástasis en modelos *in vivo* de melanoma con mutación en *Braf*^{V600E} y pérdida de Pten, así como en el modelo con mutación en N-Ras (Damsky *et al.*, 2011; Gallagher *et al.*, 2013). Adicionalmente, el receptor nuclear LXR β constituye un supresor de metástasis, mediante la inducción de la expresión de apolipoproteína E (Pencheva *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha descrito que la proteína p62 incrementa la estabilidad del mRNA de varios factores pro-metastásicos como FERMT2, una proteína implicada en adhesión y migración celular, de modo que la expresión de p62 y FERMT2 en pacientes con melanoma se correlaciona con elevado riesgo de metástasis (Karras *et al.*, 2019).

Por otra parte, las células de melanoma se caracterizan por una elevada plasticidad, ya que pueden cambiar de un programa de expresión génica proliferativo a uno invasivo, y viceversa (Widmer *et al.*, 2012; Arozarena y Wellbrock, 2019). Las células con fenotipo proliferativo se dividen activamente y expresan el factor de transcripción MITF, mientras que las células de fenotipo invasivo y metastásico reducen la expresión de MITF y aumentan los niveles de Wnt5A y AXL (Wellbrock y Arozarena, 2015). De esta manera, las células tumorales pueden cambiar de un estado a otro en los diferentes estadios de la progresión del melanoma de forma dependiente del microambiente tumoral y mediante mecanismos epigenéticos (Widmer *et al.*, 2012; Wellbrock y Arozarena, 2015; Arozarena y Wellbrock, 2019).

2. La familia de las MAP quinasas

Las MAP quinasas regulan múltiples procesos celulares como supervivencia, proliferación, senescencia, diferenciación y migración celular. Las vías de señalización de las MAP quinasas se caracterizan por la activación de cascadas de fosforilación en respuesta a estímulos extracelulares y a eventos de adhesión o estrés celular, que terminan en la activación de una MAP quinasa efectora (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; Roskoski, 2012; Yang, Sharrocks *et al.*, 2013) (**Figura 2**). Cada tipo de MAP quinasa es activada por fosforilación por quinasas específicas (MAPKK o MAP2K), que a su vez son fosforiladas por quinasas de MAPKK (MAPKKK o MAP3K). En mamíferos, las MAP quinasas se clasifican en cuatro grupos: ERK (Erk1/MAPK3 y Erk2/MAPK1), que son cruciales en la regulación de proliferación, migración celular y supervivencia celular; JNK y p38/SAPK, activadas en respuesta a estrés e implicadas en respuesta inmunitaria; y Erk5/BMK, involucrada en proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Yang, Sharrocks *et al.*, 2013). Además de sus funciones en condiciones fisiológicas, la desregulación de las MAP quinasas se ha visto implicada en diferentes tipos de cáncer.

proteína quinasa A (PKA) (Dhillon *et al.*, 2002) y por Akt (Zimmermann y Moelling, 1999), y que están localizados en la región N-terminal (Rommel *et al.*, 1996). Tras la estimulación con mitógenos, Ras-GTP recluta a las proteínas RAF a la membrana plasmática mediante su interacción con los dominios de unión a Ras (RBD) presentes en RAF (Fabian *et al.*, 1994; Nassar *et al.*, 1995). En este paso también es importante el dominio rico en cisteínas (CRD) de RAF, que interacciona con fosfolípidos de la membrana plasmática (Roy *et al.*, 1997), y con grupos farnesilo de la región C-terminal de Ras (Williams *et al.*, 2000). La interacción con Ras-GTP causa la pérdida de la conformación auto-inhibida de RAF y se correlaciona con la desfosforilación de los sitios de unión de 14-3-3 y su liberación. Aunque el mecanismo no se conoce con detalle, se ha mostrado que las proteínas fosfatasa PP2A y PP1 participan en este proceso (Abraham *et al.*, 2000; Jaumot y Hancock, 2001; Ory *et al.*, 2003). El reclutamiento de RAF a la membrana permite que otras quinasas como las de la familia de quinasas Src (SFK) y la caseína quinasa 2 (CK2) fosforilen varios sitios en una región cargada negativamente próxima al dominio quinasa (residuos 338-341 de CRAF; residuos 446-447 de BRAF), causando su activación parcial (Cleghon y Morrison, 1994; Ritt *et al.*, 2007). La fosforilación de CRAF en Ser338 también puede estar mediada por miembros de la familia PAK (King *et al.*, 1998; Tran y Frost, 2003; Lu *et al.*, 2017).

No obstante, para que se produzca la activación completa de RAF es esencial su dimerización. Se ha propuesto que la formación de nanoclusters de Ras-GTP en la membrana contribuye al reclutamiento de las moléculas de RAF, promoviendo así la formación de homo o heterodímeros (Rushworth *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007; Rajakulendran *et al.*, 2009; Lavoie y Therrien, 2015). En este paso también participa la proteína 14-3-3 mediante el reconocimiento de residuos de serina fosforilados de la región C-terminal de RAF, lo que probablemente estimula la interacción entre ambos protómeros (Rushworth *et al.*, 2006; Lavoie y Therrien, 2015). De esta manera, la dimerización de RAF estabiliza la conformación activa de la quinasa de forma alostérica y, tras la fosforilación en el segmento de activación del dominio quinasa (Thr599 y Ser602 en BRAF; Thr491 y Ser494 en CRAF), se induce su actividad catalítica (Hu *et al.*, 2013; Lavoie y Therrien, 2015).

Los dímeros activos de RAF fosforilan residuos de serina específicos en MEK1 (Ser218, Ser222) y MEK2 (Ser222, Ser226), causando su activación. Aunque las isoformas de RAF son las principales MAP3Ks en la vía de señalización MAPK/ERK, otras MAP3Ks son MEKK1, c-Mos y COT (también conocida como MAP3K8 o Tpl-2), las cuales fosforilan a MEK1/2 en determinados tipos celulares o en respuesta a estímulos específicos (Raman *et al.*, 2007; Roskoski, 2012). A su vez, MEK1/2 cataliza la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina en la secuencia específica T-E-Y (treonina-ácido glutámico-tirosina) presente en el segmento de activación de Erk1 (Thr202, Tyr204) y Erk2 (Thr185, Tyr187) (Kidger *et al.*, 2018). MEK1/2 fosforila en primer lugar el correspondiente residuo de tirosina de Erk1/2, y posteriormente Erk1/2 se disocia de MEK1/2 para unirse de nuevo a las mismas moléculas de MEK1/2 u otras, que catalizan la fosforilación de los residuos de treonina (Ferrell y Bhatt, 1997; Aoki *et al.*, 2011). La activación total de Erk1/2 solo se consigue cuando ambos residuos de tirosina y treonina están fosforilados (Aoki *et al.*, 2011; Roskoski, 2012).

Para que la transmisión de las señales a través de la ruta Ras-RAF-MEK-ERK funcione correctamente, también son necesarias proteínas *scaffold* como KSR1/2 o IQGAP1, las cuales mantienen los diferentes componentes de la ruta en proximidad y en la orientación adecuada (Casar y Crespo, 2016). Se han identificado hasta 15 proteínas *scaffold* implicadas en la vía MAPK/ERK, siendo algunas de ellas específicas de determinadas localizaciones subcelulares, lo cual permite la regulación espacial de la señalización de Erk1/2 y la especificidad de sus sustratos (Casar *et al.*, 2009). En algunos casos, las proteínas *scaffold* pueden actuar como estimuladores que inducen alostéricamente la actividad quinasa de RAF (Rajakulendran *et al.*, 2009), y favorecen la fosforilación de MEK1/2 por RAF, como es el caso de KSR1 (Brennan *et al.*, 2011).

Mientras que RAF solo fosforila a MEK1/2, y Erk1/2 constituye el único sustrato conocido de MEK1/2, Erk1/2 es una serina/treonina quinasa que fosforila a más de 175 proteínas, tanto citosólicas como nucleares (**Figura 3**) (Roskoski, 2012). En el núcleo, Erk1/2 fosforila múltiples factores de transcripción, como los miembros de la familia ETS, siendo Elk1 uno de los más estudiados (Hollenhorst *et al.*, 2011). La fosforilación de ETS causa un aumento de su actividad transcripcional, y como consecuencia se induce la expresión de genes de respuesta temprana como *c-FOS* o *c-MYC*, que a su vez regulan genes de respuesta tardía (Hollenhorst *et al.*, 2011). La proteína c-Fos, que junto con c-Jun constituye el factor de transcripción AP-1, también es fosforilada y estabilizada en el núcleo por Erk1/2 (Murphy *et al.*, 2002). Como resultado de la regulación de los diferentes factores de transcripción, se activa o se reprime la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular, supervivencia, diferenciación celular o senescencia (O'Donnell *et al.*, 2012; Ünal *et al.*, 2017).

Por otra parte, Erk1/2 fosforila en el citosol a más de 50 proteínas que controlan la proliferación, migración, metabolismo, fisión mitocondrial o apoptosis (Roskoski, 2012; Cook *et al.*, 2017; Ünal *et al.*, 2017; Kidger *et al.*, 2018). Entre los sustratos citosólicos de Erk1/2 con mayor relevancia en cáncer se encuentran las serina/treonina quinasas de la familia RSK (RSK1-4), las cuales catalizan a su vez la fosforilación de hasta 35 proteínas (Anjum y Blenis, 2008). En concreto, se ha descrito que RSK regula la transcripción génica mediante la fosforilación de factores de transcripción como CREB, SRF, NF- κ B, NFAT o TIF1A. Asimismo, RSK fosforila la proteína ribosomal S6 y eIF4B, favoreciendo la traducción de proteínas y el crecimiento celular. Adicionalmente, RSK fosforila el factor pro-apoptótico Bad y el inhibidor de ciclo celular p27^{KIP1} (Anjum y Blenis, 2008). Otros sustratos directos de Erk1/2 en el citosol son proteínas del citoesqueleto como palladin, paxilina y MLCK (Roskoski, 2012). Además, Erk1/2 regula otras proteínas de las vías PI3K/Akt o TGF- β , dando lugar al *crosstalk* entre vías de señalización.

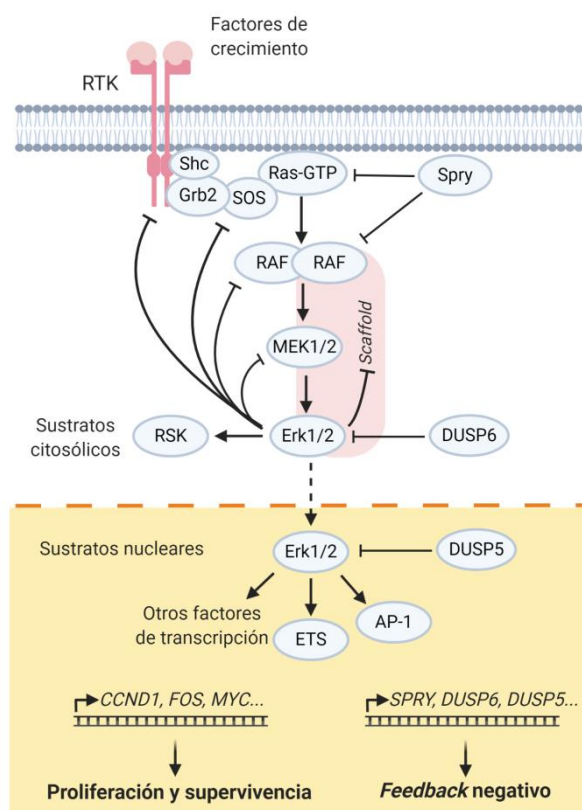


Figura 3. Vía de señalización de Erk1/2. Esquema simplificado de la vía de Erk1/2 en condiciones fisiológicas, indicando los mecanismos *feedback* negativos. (Adaptado de Lito *et al.*, 2013).

2.2. Regulación *feedback* negativa de la vía MAPK/ERK

Dada la implicación de Erk1/2 en múltiples procesos celulares, la magnitud, la duración y la localización subcelular de su señalización deben estar altamente controladas, de manera que se produzcan las respuestas celulares adecuadas. Por ello, existen varios mecanismos de retroalimentación o regulación *feedback* negativa en la vía MAPK/ERK (Figura 3).

Por una parte, se produce la modificación post-traducciona de componentes de la vía de señalización MAPK/ERK de forma casi inmediata tras la activación de esta vía. De esta manera, Erk1/2 es capaz de fosforilar e inhibir directamente a RTKs. En concreto, Erk1/2 fosforila a EGFR en el residuo Thr669, afectando a la activación cruzada de los dímeros del receptor, y por tanto disminuyendo la fosforilación de tirosinas en el dímero (Takishima *et al.*, 1991; Morrison *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2013). Además, se ha descrito la regulación negativa de FGFR1, mediante la fosforilación de Ser777 por Erk1/2 (Zakrzewska *et al.*, 2013). El *feedback* negativo de Erk1/2 hacia GEFs también contribuye a que la activación de Ras sea transitoria. La proteína GEF SOS1 es fosforilada en varios residuos de serina por Erk2, causando su disociación de las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc, e impidiendo así su reclutamiento a la membrana plasmática y la activación de Ras (Corbalan-Garcia *et al.*, 1996; Kamioka *et al.*, 2010).

Asimismo, CRAF es fosforilado en varias serinas por Erk1/2, y de esta manera se impide su asociación con Ras y su localización en la membrana plasmática, interfiriendo con su activación (Dougherty *et al.*, 2005). Adicionalmente, se han identificado varios

sitios de fosforilación dependiente de Erk1/2 en BRAF, en posiciones similares a las que se observan en CRAF (Brummer *et al.*, 2003). La fosforilación de BRAF por Erk1/2, además de inhibir la interacción con Ras activo, interfiere con la dimerización de BRAF con CRAF (Ritt *et al.*, 2010). La actividad quinasa de MEK1 puede ser también inhibida por Erk1/2 mediante la fosforilación en Thr292 y Thr386 (Brunet *et al.*, 1994; Eblen *et al.*, 2004). Aunque no se ha descrito ninguna fosforilación inhibidora de MEK2, la fosforilación de Thr292 en MEK1 reduce la actividad de MEK2 en los dímeros MEK1-MEK2 (Catalanotti *et al.*, 2009). Por otra parte, la proteína scaffold KSR1 es diana de fosforilación por Erk1/2 (Cacace *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 2009; Lake *et al.*, 2016), lo que impide su unión a BRAF, la formación del complejo KSR1-BRAF-MEK1/2 y su localización en la membrana plasmática, alterando así la transmisión de las señales en la vía MAPK/ERK (McKay *et al.*, 2009).

Por otro lado, otros mecanismos de regulación negativa de la vía MAPK/ERK que tienen lugar de forma más tardía que los mecanismos mencionados anteriormente implican expresión *de novo* de proteínas inhibidoras. Así, Erk1/2 induce la expresión de las fosfatasa de especificidad dual DUSP5 y DUSP6/MKP3, las cuales desfosforilan e inactivan a Erk1/2 de forma específica en el núcleo y citoplasma, respectivamente (Ekerot *et al.*, 2008; Kucharska *et al.*, 2009; Kidger y Keyse, 2016). El factor de transcripción ETS1, sustrato de Erk1/2, es capaz de unirse al promotor del gen *DUSP6* y activar su transcripción (Ekerot *et al.*, 2008). Además, DUSP5 y DUSP6 pueden retener a Erk1/2 desfosforilado en el núcleo o en el citoplasma, retrasando así su reactivación (Karlsson *et al.*, 2004; Mandl *et al.*, 2005). Erk1/2 induce asimismo la expresión de las proteínas Sprouty (Spry1-4) (Lake *et al.*, 2016), aunque el mecanismo por el cual Spry inhibe la activación de la ruta MAPK/ERK no está claro, y probablemente dependa del contexto celular. Se ha descrito que Spry1 y Spry2 fosforilados presentan sitios de unión a Grb2, interfiriendo así con la activación de la vía Ras-MAPK (Hanafusa *et al.*, 2002), mientras que otros estudios sugieren que Spry2 (Yusoff *et al.*, 2002) y Spry4 (Sasaki *et al.*, 2003) actuarían inhibiendo a CRAF.

2.3. La mutación BRAF^{V600E} y la vía MAPK/ERK

Como ya se ha mencionado, la mutación en BRAF^{V600} es la más común en melanoma, y en la mayoría de los casos implica la sustitución de la valina por un ácido glutámico (BRAF^{V600E}) (Davies *et al.*, 2002). Esta mutación está localizada en el segmento de activación del dominio quinasa de BRAF, entre dos sitios de fosforilación (Thr599 y Ser602) que tienen función reguladora de la actividad quinasa, de manera que la sustitución V600E mimetiza estas fosforilaciones activadoras. BRAF contiene la estructura típica del dominio quinasa, consistente en un lóbulo N-terminal y un lóbulo C-terminal unidos por una región bisagra flexible. En la interfaz entre los dos lóbulos se encuentra el sitio activo de la quinasa, que incluye el sitio de unión a ATP, el sitio de unión a magnesio o motivo DFG (ácido aspártico-fenilalanina-glicina), y el sitio aceptor de fosfato o segmento de activación (Bollag *et al.*, 2010). Así, la conformación del motivo DFG puede ser DFG-in, en la que el residuo de fenilalanina no interfiere con la unión del ATP y permite la actividad catalítica de la quinasa, o bien el estado DFG-out en el cual se impide el acceso del ATP a su sitio de unión (Hari *et al.*, 2013). El análisis de la estructura de BRAF^{V600E} mostró que la formación de un puente salino entre el ácido glutámico en la posición 600 y un residuo de lisina (Lys507) en la hélice α C promueve la conformación activa del dominio

quinasa (DFG-in), causando así la activación constitutiva de la quinasa (Tsai *et al.*, 2008; Bollag *et al.*, 2010; Bollag *et al.*, 2012). Esta reorganización estructural representa una parte de los cambios conformacionales que ocurren en la dimerización de proteínas RAF, lo cual podría explicar la causa por la que BRAF^{V600E} está activo en forma monomérica (Röring *et al.*, 2012; Thevakumaran *et al.*, 2015). Otras mutaciones menos frecuentes implican la sustitución por otro aminoácido voluminoso cargado negativamente (BRAF^{V600D}), o por un aminoácido básico (BRAF^{V600K/R}). Aunque estos últimos no serían capaces de formar el puente salino con el residuo Lys507, también podrían alterar la conformación del segmento de activación del dominio quinasa (Thevakumaran *et al.*, 2015).

De esta manera, la forma BRAF^{V600E} está constitutivamente activa y no requiere la formación de dímeros con otras proteínas RAF para la fosforilación y activación de MEK1/2 (Wan *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2013). En consecuencia, en células tumorales que expresan BRAF^{V600E}, MEK1/2 y Erk1/2 se encuentran hiperactivados, y Erk1/2 constituye el principal promotor de proliferación y supervivencia celular (Pratilas *et al.*, 2009) (**Figura 4**). Debido a la elevada activación de Erk1/2, se inducen los mecanismos de regulación negativa dependientes de Erk1/2 mencionados previamente, entre ellos la expresión de proteínas Sprouty, causando una disminución de los niveles de Ras-GTP (Lito *et al.*, 2012). No obstante, dado que BRAF^{V600E} se encuentra activo en forma monomérica e independientemente de la activación de Ras, la disminución de Ras-GTP no afecta a la activación de BRAF (Yao *et al.*, 2015). Por otra parte, la hiperactivación de BRAF induce asimismo la expresión de fosfatasas DUSPs, las cuales desfosforilan Erk1/2 y permiten el mantenimiento de un nivel de activación que promueve la transformación oncogénica en lugar de senescencia (Zhu *et al.*, 1998; Kidger *et al.*, 2017).

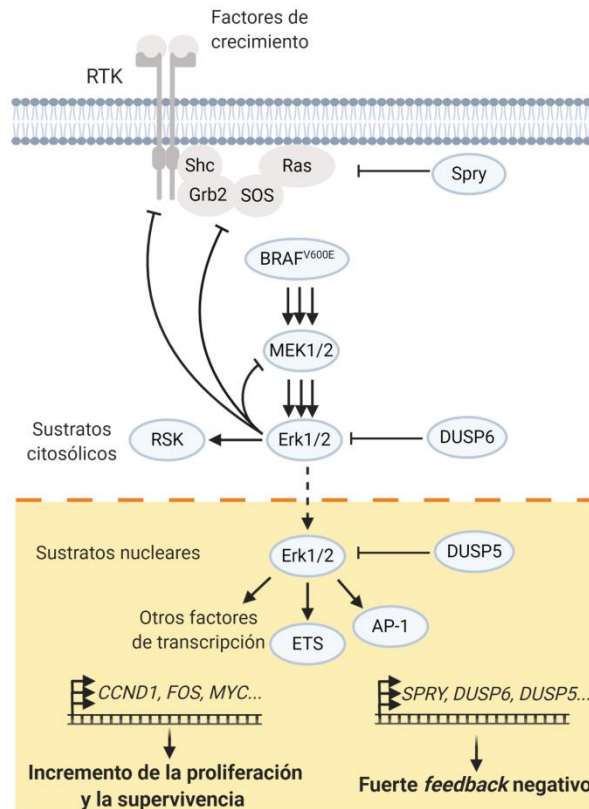


Figura 4. La ruta MAPK/ERK en células con mutación en BRAF. Se representan en gris los componentes de la ruta que se encuentran inhibidos debido a la fuerte regulación negativa dependiente de la hiperactivación de Erk1/2. (Adaptado de Lito *et al.*, 2013).

Por el contrario, en células tumorales con mutación en RTKs o Ras y que expresan proteínas RAF *wild type*, los mecanismos reguladores negativos reducen la activación de varios componentes de la vía, dando lugar a niveles basales de activación de MEK1/2 y Erk1/2 menores con respecto a los observados en células con BRAF^{V600E} (Lake *et al.*, 2016). En este tipo de tumores, además de la activación de Erk1/2, los RTKs y/o Ras activan otras vías de señalización que promueven supervivencia celular, como la ruta PI3K/Akt.

3. El tratamiento del melanoma

En estadios iniciales, el melanoma es curable en la gran mayoría de los pacientes mediante resección quirúrgica. No obstante, en fases avanzadas de la enfermedad en las que el melanoma es invasivo o metastásico, la supervivencia disminuye considerablemente (Balch *et al.*, 2009). Anteriormente, el único tratamiento aprobado por la FDA era la dacarbazina, un agente quimioterapéutico alquilante de escasa eficacia en pacientes con melanoma (Crosby *et al.*, 2000) (Figura 5). El descubrimiento de la mutación BRAF^{V600E} en el año 2002 (Davies *et al.*, 2002), impulsó el desarrollo de inhibidores selectivos de dicha mutación, como el vemurafenib o el dabrafenib. Esto supuso un gran avance en el tratamiento del melanoma metastásico, puesto que se incrementó considerablemente la tasa de respuesta y la supervivencia de los pacientes. Posteriormente, tras el desarrollo de inhibidores de MEK1/2 como el trametinib o el

cobimetinib, varias combinaciones de inhibidores de BRAF y de MEK fueron aprobadas por la FDA y la EMA, y actualmente constituye la estrategia terapéutica dirigida estándar en pacientes de melanoma con la mutación BRAF^{V600E/K}. Sin embargo, la eficacia del tratamiento con inhibidores de la vía MAPK/ERK se encuentra limitada por la adquisición de resistencia, cuyos mecanismos serán detallados más adelante. Puesto que en una buena parte de casos la resistencia a inhibidores de BRAF y/o de MEK está asociada a la reactivación de Erk1/2, en los últimos años se ha impulsado el diseño de inhibidores selectivos de Erk1/2, con el objetivo de conseguir una mayor supresión de la vía MAPK/ERK y reducir así la aparición de resistencias. Por otra parte, la inmunoterapia está adquiriendo una gran relevancia en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el melanoma metastásico (Figura 5). Además, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos para evaluar inhibidores de otras vías de señalización, como PI3K/Akt, o inhibidores de Cdk4/6 y de varios RTKs, ya sea como monoterapia o en combinación con inhibidores de la vía MAPK/ERK o con inmunoterapia (Menzies y Long, 2014; Najem *et al.*, 2017). Muchas de estas nuevas combinaciones son el resultado de la identificación de mecanismos de resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK, aunque de momento ninguna de ellas ha sido aprobada para su uso en la práctica clínica.

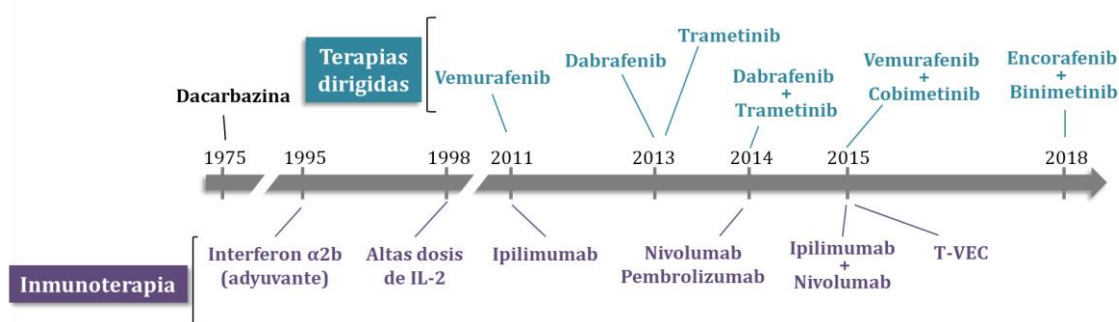


Figura 5. Cronología de terapias aprobadas por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico.

Se muestra la dacarbazina (quimioterapia convencional), y diferentes inhibidores de BRAF (vemurafenib, dabrafenib y encorafenib) y de MEK (trametinib, cobimetinib y binimetinib). Las inmunoterapias aprobadas incluyen el tratamiento con citoquinas (interferon α2b, IL-2), anticuerpos anti-CTLA-4 (ipilimumab), anticuerpos anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) así como la inyección intratumoral de virus oncolíticos (T-VEC).

3.1. Inhibición de BRAF

Tras descubrirse la alta frecuencia de la mutación BRAF^{V600E} en melanoma, comenzó la búsqueda de inhibidores selectivos de la quinasa activa. El primer candidato fue PLX4720, un compuesto capaz de inhibir a BRAF^{V600E} con alta especificidad tanto *in vitro* como *in vivo*, y que presentaba una biodisponibilidad adecuada tras su administración por vía oral (Tsai *et al.*, 2008). Posteriormente, este compuesto fue reformulado para mejorar sus características farmacocinéticas y dio lugar a PLX4032, más comúnmente conocido como vemurafenib (nombre derivado de **V600E mutated BRAF enzyme inhibition**).

En estudios preclínicos se observó que el vemurafenib inhibe la fosforilación de Erk1/2 en líneas celulares de melanoma con la mutación BRAF^{V600E}, causando la parada del ciclo celular y la inhibición de la proliferación, así como la inducción de apoptosis

(Yang, Higgins *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Søndergaard *et al.*, 2010). Además, se demostró su capacidad de inhibir el crecimiento de tumores BRAF^{V600E} en modelos de xenoinjerto de ratón, incrementando la supervivencia de los animales (Bollag *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). En la fase inicial de ensayo clínico, se observó que alrededor del 80% de los pacientes con melanoma que presentaban la mutación BRAF^{V600E} respondían favorablemente al tratamiento con vemurafenib, administrado a la dosis máxima tolerable (Flaherty *et al.*, 2010). En el posterior ensayo de fase III, el 48% de los pacientes con melanoma metastásico con mutación en *BRAF* respondieron de forma positiva al vemurafenib frente a tan solo el 5% de pacientes que respondieron a dacarbazina (Chapman *et al.*, 2011). En este estudio, el vemurafenib incrementó de forma significativa la supervivencia libre de progresión de los pacientes (5.3 meses), en comparación con la dacarbazina (1.6 meses), y los efectos adversos fueron tolerables (Flaherty *et al.*, 2010; Chapman *et al.*, 2011; Sosman *et al.*, 2012). En base a estos buenos resultados, el vemurafenib fue aprobado por la FDA en 2011 y por la EMA en 2012 para el tratamiento del melanoma metastásico con la mutación BRAF^{V600E}. La continuación del estudio de fase III confirmó que el tratamiento con vemurafenib a largo plazo se asocia a una mayor supervivencia (Chapman *et al.*, 2017), y además, se han observado respuestas clínicas positivas en pacientes con metástasis cerebrales (McArthur *et al.*, 2017).

En cuanto a su mecanismo de acción, el vemurafenib es un inhibidor de tipo ATP-competitivo reversible selectivo para BRAF^{V600E/K/D/R}. El compuesto inhibe la fosforilación de Erk1/2 en células con mutación en *BRAF*, pero no resulta efectivo en células con *BRAF wild type* (Yang, Higgins *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Søndergaard *et al.*, 2010), dando lugar a un elevado índice terapéutico (Flaherty *et al.*, 2010). Esta propiedad del vemurafenib se explica en parte por su unión preferente a la quinasa en la conformación activa DFG-in, la cual está estabilizada por la mutación V600E (Bollag *et al.*, 2012), como se ha explicado anteriormente. Por otra parte, la selectividad del vemurafenib por BRAF^{V600E} también se debe a que este inhibidor es efectivo frente a BRAF en forma monomérica, pero no actúa sobre homodímeros (BRAF-BRAF) o heterodímeros de RAF (BRAF-CRAF) (**Figura 6**). Esto es consecuencia de los cambios conformacionales que el inhibidor provoca en la hélice α C del lóbulo N-terminal del dominio quinasa, la cual participa en la dimerización de BRAF y es importante para la activación de la quinasa (Haling *et al.*, 2014). El vemurafenib estabiliza la hélice α C del dominio quinasa de BRAF en posición hacia afuera (α C-out), que corresponde a la posición inactiva. Sin embargo, cuando BRAF se encuentra formando un dímero, aunque el inhibidor induce posición hacia afuera de la hélice α C en el primer protómero, estabiliza la posición hacia adentro (α C-in) activa en el segundo protómero (**Figura 6B**). Este cambio de conformación en el segundo protómero reduce la afinidad del mismo por la molécula del inhibidor, fenómeno conocido como alosterismo negativo (Karoulia *et al.*, 2017). Puesto que las proteínas BRAF^{V600E/K/D/R} actúan como monómeros en ausencia de Ras activo, el vemurafenib inhibe de forma selectiva estas formas mutantes frente a BRAF *wild type* (**Figura 6A**). Por el contrario, cualquier alteración molecular que cause la formación de dímeros de RAF provoca resistencia a este inhibidor (Poulikakos *et al.*, 2011; Lito *et al.*, 2012).

Tras el éxito del vemurafenib, otros inhibidores de BRAF fueron aprobados para su uso en la práctica clínica, como el dabrafenib (GSK2118436) y el encorafenib. Estos compuestos, al igual que el vemurafenib, inhiben de forma específica las proteínas

mutadas BRAF^{V600E/K/D} mediante la estabilización de la quinasa en la conformación DFG-in/ α C-out (Karoulia *et al.*, 2017). En pacientes con melanoma metastásico con mutación en BRAF, el tratamiento con dabrafenib incrementó significativamente la supervivencia libre de progresión (5.1 meses) con respecto al tratamiento con dacarbazina (2.7 meses) (Hauschild *et al.*, 2012). Dada su efectividad, el dabrafenib fue aprobado por la FDA y la EMA en 2013. Por su parte, el encorafenib, aprobado desde 2018, presenta una mayor vida media con respecto a vemurafenib o dabrafenib, debida a la baja tasa de disociación de su sustrato, una propiedad que permite una inhibición más prolongada de BRAF (Delord *et al.*, 2017).

3.1.1. Activación de la vía MAPK/ERK por inhibidores de BRAF

En estudios preclínicos y clínicos se observó que los inhibidores de BRAF inducen la activación “paradójica” de Erk1/2 en células que expresan BRAF *wild type* en presencia de Ras activo (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010). Esto se debe a que la unión del inhibidor a BRAF *wild type* promueve la interacción de BRAF con Ras-GTP, y en consecuencia se induce la formación de homo y heterodímeros de RAF. Se ha propuesto que la posición hacia adentro de la hélice α C (α C-in), y en concreto del residuo Arg506, es la responsable de la interacción RAF-Ras. De esta manera, aunque el inhibidor de BRAF induce la conformación hacia afuera de la hélice α C (α C-out), desplaza el residuo Arg506 a la posición *in* promoviendo la interacción con Ras-GTP y la dimerización (Karoulia *et al.*, 2016). Puesto que el vemurafenib no es capaz de inhibir a BRAF en forma de dímeros por el mecanismo de alosterismo negativo mencionado anteriormente, la dimerización de BRAF se traduce en la activación de Erk1/2 en presencia del inhibidor (Figura 6B). En concreto, en células BRAF *wild type* con mutación en Ras, se ha observado que los inhibidores de BRAF inducen la dimerización de BRAF con CRAF y la activación de CRAF (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010).

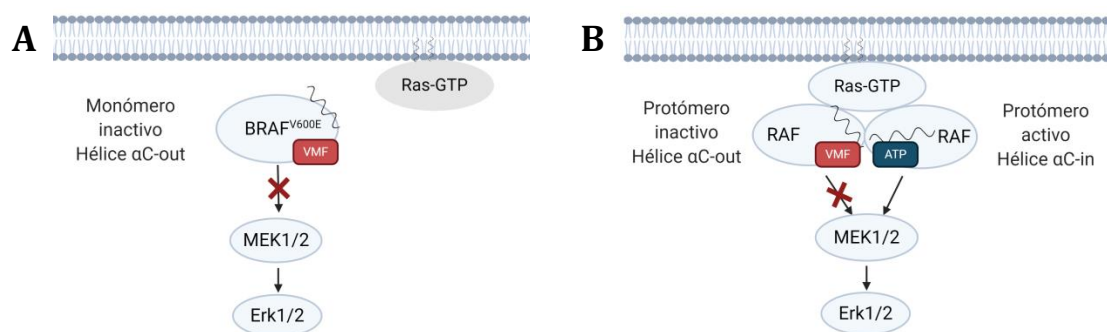


Figura 6. Mecanismo de acción del vemurafenib en monómeros y en dímeros de RAF. (A) Inhibición de la señalización de Erk1/2 por el vemurafenib en células con monómeros de BRAF^{V600E}. (B) Activación “paradójica” de RAF inducida por vemurafenib en células que presentan dímeros de RAF. (Adaptado de Karoulia *et al.*, 2017).

Una consecuencia de la activación de Erk1/2 causada por los inhibidores de BRAF en células BRAF *wild type* es el desarrollo de queratoacantomas y carcinomas de células escamosas. Estos tumores secundarios se presentan en el 14-26% de los pacientes de melanoma tratados con vemurafenib o dabrafenib, y suelen asociarse a mutaciones en HRAS (Oberholzer *et al.*, 2012; Su, Viros, *et al.*, 2012). En un modelo de ratón de carcinogénesis mediada por HRAS, el tratamiento con un inhibidor de BRAF acelera el

crecimiento de los tumores cutáneos, sugiriendo que la activación “paradójica” de Erk1/2 en células con mutación en Ras promueve la formación de dichas lesiones cutáneas (Su, Viros, *et al.*, 2012).

3.2. Inhibidores de MEK y tratamiento combinado con inhibidores de BRAF

El primer inhibidor de MEK1 y MEK2 que fue aprobado para su uso en pacientes con melanoma metastásico fue el trametinib (GSK1120212). El trametinib es un inhibidor alostérico reversible de tipo no ATP-competitivo, cuyo sitio de unión se localiza adyacente al sitio del ATP, de manera que tanto el ATP como el inhibidor pueden unirse de forma simultánea a la quinasa. Este inhibidor se une a MEK1/2 en la conformación inactiva de la quinasa y promueve la disociación de los complejos RAF-MEK1/2 (Roskoski, 2017). En estudios enzimáticos *in vitro* y en ensayos celulares, el trametinib impidió la fosforilación de MEK1/2 dependiente de RAF, dando lugar a la inhibición de la activación de Erk1/2 (Gilmartin *et al.*, 2011). Como consecuencia, el trametinib inhibe la proliferación de líneas celulares tumorales con mutación en *BRAF* o en *RAS*, y el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto en ratón (Abe *et al.*, 2011; Gilmartin *et al.*, 2011). En fases iniciales de los ensayos clínicos, se observó una mayor tasa de respuesta al trametinib en pacientes de melanoma con mutación en *BRAF* (33%) que en aquellos que presentaban *BRAF wild type* (10%) (Falchook *et al.*, 2012). Asimismo, se detectó una baja tasa de respuesta en pacientes previamente tratados con inhibidores de BRAF, sugiriendo la existencia de mecanismos de resistencia comunes a ambos inhibidores (Kim *et al.*, 2013). La aprobación por la FDA se obtuvo en 2013, tras observar el incremento de la supervivencia libre de progresión en pacientes de melanoma con mutación *BRAF^{V600E/K}* tratados con trametinib (4.8 meses) con respecto a los tratados con dacarbazina o paclitaxel (1.5 meses) (Flaherty, Robert, *et al.*, 2012). No obstante, la tasa de respuesta observada (22%) fue inferior a la del vemurafenib (48%) o dabrafenib (52%). Esto se debe a que la toxicidad asociada a la inhibición de MEK1/2 en tejidos normales reduce el índice terapéutico del fármaco, limitando la dosis máxima tolerable y disminuyendo la respuesta clínica de los pacientes.

El principal uso del trametinib en melanoma es en combinación con inhibidores de BRAF, especialmente dabrafenib, para conseguir una inhibición más potente y duradera de Erk1/2 (Flaherty, Infante, *et al.*, 2012), ya que la mayoría de casos de resistencia a inhibidores de BRAF se asocian a la reactivación de la vía MAPK/ERK. La eficacia de esta terapia combinada se confirmó en un ensayo clínico de fase III, en el cual tanto la supervivencia libre de progresión como la tasa de respuesta global de los pacientes tratados con dabrafenib y trametinib fue superior a la de aquellos tratados con dabrafenib solo (Long, Stroyakovskiy *et al.*, 2014). Además, ambos inhibidores tienen efectos antagónicos en las células con *BRAF wild type*, de manera que la inclusión de un inhibidor de MEK permite contrarrestar la activación “paradójica” de Erk1/2 causada por el inhibidor de BRAF en estas células. Como consecuencia, se produce una menor incidencia de tumores secundarios cutáneos en los pacientes tratados con ambos fármacos en comparación con la monoterapia con dabrafenib o vemurafenib (Long, Stroyakovskiy *et al.*, 2014). En base a estos buenos resultados, la combinación de dabrafenib y trametinib fue aprobada por la EMA (2013) y por la FDA (2014) para el tratamiento de melanoma metastásico con mutación *BRAF^{V600E/K}*, y actualmente constituye la terapia dirigida estándar para este tipo de melanomas. Tras la aprobación de esta terapia, se han publicado datos de supervivencia global a largo plazo de pacientes tratados con ambos

inhibidores (25.1 meses), que han confirmado la mejora de las respuestas clínicas a este tratamiento con respecto a la monoterapia (supervivencia de 17.8 meses) (Long *et al.*, 2015). Tras 3 años de tratamiento, la tasa de supervivencia global de los pacientes tratados con dabrafenib y trametinib fue del 44%, frente al 32% de los pacientes que recibieron monoterapia (Long, Flaherty, *et al.*, 2017). La terapia combinada también ha mostrado su eficacia como adyuvante tras la resección del tumor, es decir, para prevenir la recaída en la enfermedad, por lo que está aprobada para este uso desde 2018 (Long, Hauschild, *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se han implementado otras combinaciones de inhibidores de BRAF y MEK. En 2015, se aprobó el uso de vemurafenib en combinación con cobimetinib para el tratamiento de melanoma con mutación BRAF^{V600E/K}. El cobimetinib es un inhibidor alostérico altamente selectivo de MEK1 y MEK2, y su combinación con vemurafenib incrementa la tasa de respuesta en pacientes de melanoma metastásico con respecto a la monoterapia con vemurafenib (68% frente al 45%), así como la supervivencia global (22.3 meses frente a 17.4 meses) (Larkin *et al.*, 2014; Ascierto *et al.*, 2016). Además, el desarrollo de carcinomas de células escamosas como consecuencia de la toxicidad del vemurafenib fue menos frecuente (Dréno *et al.*, 2017). Otro tratamiento de este tipo incorporado a la práctica clínica desde 2018 ha sido la combinación de encorafenib y binimetinib, siendo este último otro inhibidor alostérico de MEK1 y MEK2. Dicha combinación aumenta significativamente la supervivencia global (33.6 meses) con respecto a vemurafenib (16.9 meses) en pacientes de melanoma con mutación BRAF^{V600E/K} (Dummer *et al.*, 2018).

3.2.1. Inhibidores de MEK en tumores con mutación en Ras

Se ha propuesto el uso de inhibidores de MEK1 y MEK2 para el tratamiento del melanoma con mutación en *NRAS*, aunque hasta la fecha no existe ninguna terapia aprobada por la FDA o la EMA (Sarkisian y Davar, 2018). El inhibidor de MEK con resultados más prometedores fue el binimetinib, puesto que este fármaco incrementó la supervivencia libre de progresión en pacientes de melanoma con mutación en *NRAS*, con respecto a la dacarbazina (2.7 meses frente a 1.5 meses, respectivamente) (Dummer *et al.*, 2017). Sin embargo, este aumento de la supervivencia no fue suficiente para la aprobación de su uso en la práctica clínica (Koelblinger y Dummer, 2017).

Se ha planteado que la menor efectividad de los inhibidores de MEK en tumores con mutación en Ras comparado con melanoma con mutación en BRAF^{V600E} se debe, en parte, a la pérdida de la regulación negativa dependiente de Erk1/2 tras el tratamiento con estos inhibidores (Hatzivassiliou *et al.*, 2013; Lito *et al.*, 2014; Caunt *et al.*, 2015). Como se ha explicado anteriormente, Erk1/2 activado fosforila a BRAF y CRAF y disminuye así la formación de dímeros activos. En células con mutación en *KRAS*, la disminución de fosfo-Erk1/2 en respuesta al tratamiento con el inhibidor de MEK se traduce en un incremento de la fosforilación de CRAF y, en consecuencia, en el aumento de la fosforilación de MEK1/2 y la recuperación parcial de la activación de Erk1/2. Esto se ha observado con inhibidores de MEK que bloquean su actividad catalítica pero permiten la fosforilación de MEK1/2 por RAF, como son el cobimetinib y el binimetinib. Sin embargo, los inhibidores como el trametinib que, además de inhibir la actividad quinasa de MEK1/2, impiden la fosforilación de MEK1/2 por RAF, atenúan parcialmente la reactivación de

Erk1/2 que ocurre como consecuencia de la pérdida de dicha regulación negativa (Hatzivassiliou *et al.*, 2013; Lito *et al.*, 2014; Caunt *et al.*, 2015). Por ello, éstos últimos permiten una mayor supresión de fosfo-Erk1/2 y mayor inhibición del crecimiento en ratones de tumores con mutación en *KRAS* (Hatzivassiliou *et al.*, 2013; Lito *et al.*, 2014). Aunque se trata de datos obtenidos en modelos tumorales diferentes al melanoma y que presentan *KRAS* mutado, es probable que mecanismos similares ocurran en melanoma con mutación en *NRAS*.

3.3. Inhibidores de ERK: SCH772984

Aunque la combinación de inhibidores de BRAF y de MEK ha supuesto un gran avance en el tratamiento del melanoma metastásico con mutación en BRAF, permitiendo aumentar la supervivencia de los pacientes, el principal problema que limita la eficacia de las terapias dirigidas es la adquisición de resistencia tras un tratamiento prolongado. Dicha resistencia abarca múltiples mecanismos que serán tratados con mayor detalle en el siguiente apartado. Frecuentemente, los mecanismos de resistencia descritos frente a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK son similares a los identificados previamente para los inhibidores de BRAF, implicando la recuperación de la activación de Erk1/2 (Long, Fung *et al.*, 2014; Moriceau *et al.*, 2015). Asimismo, la pérdida de los mecanismos reguladores negativos dependientes de fosfo-Erk1/2, particularmente en tumores con mutación en Ras tras la inhibición de MEK, provoca la recuperación parcial de la vía MAPK/ERK y la reactivación de Erk1/2, lo que se traduce en una falta de respuesta inicial al tratamiento (resistencia innata). Por ello, se planteó que una mayor supresión de Erk1/2 permitiría obtener respuestas más potentes y duraderas, previniendo o reduciendo la aparición de resistencias.

Con este objetivo, se desarrolló en el año 2013 el compuesto SCH772984, un inhibidor reversible de tipo ATP-competitivo altamente selectivo para Erk1/2 (Morris *et al.*, 2013; Kidger *et al.*, 2018). El tratamiento de células con mutación en *BRAF* o en *RAS* con SCH772984 no solo causó una disminución en la fosforilación de RSK (diana de Erk1/2), sino que además redujo el nivel de fosforilación de Erk1/2 (Morris *et al.*, 2013). La reducción de la fosforilación de Erk1/2 fue inesperada, puesto que no se trata de un inhibidor de MEK. Debido a esta particularidad, los inhibidores de ERK de este tipo reciben el nombre de inhibidores de mecanismo de acción dual, frente a los inhibidores catalíticos que únicamente inhiben la actividad catalítica de la quinasa y la fosforilación de sus sustratos (Kidger *et al.*, 2018) (**Figura 7**). Tras un tratamiento prolongado con SCH772984, fosfo-Erk1/2 se recupera parcialmente, debido posiblemente a la pérdida de fosforilaciones inhibitorias de CRAF dependientes de Erk1/2 (Morris *et al.*, 2013). No obstante, en esta situación, el bloqueo de la señalización entre Erk1/2 y RSK se mantiene, indicando que la capacidad de SCH772984 de inhibir la actividad quinasa de Erk1/2 es superior a la de inhibir la fosforilación de Erk1/2 por MEK1/2 (Morris *et al.*, 2013).

SCH772984 muestra una potente actividad anti-proliferativa en líneas celulares de melanoma, cáncer de colon y cáncer de páncreas, portadoras de mutaciones en *BRAF*, *NRAS* o *KRAS*, así como capacidad anti-tumoral en modelos de xenoinjerto generados a partir de dichas líneas celulares (Morris *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014). En general, se observó mayor respuesta a SCH772984 en células con mutación en *BRAF* (88% de las líneas testadas) que en aquellas que presentan mutación en *RAS* (49%). Notablemente,

SCH772984 inhibe el crecimiento de células de melanoma con resistencia a inhibidores de BRAF y MEK, siendo esta resistencia causada por la recuperación de fosfo-Erk1/2 mediante distintos mecanismos (Morris *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014). Además, la inhibición de ERK suprime más potentemente la vía MAPK/ERK y la proliferación celular que la inhibición de MEK en modelos celulares de resistencia a vemurafenib o dabrafenib (Carlino, Todd *et al.*, 2014). Por otra parte, la combinación de SCH772984 con vemurafenib retrasa la aparición de resistencia *in vitro* en células de melanoma con mutación en *BRAF* (Wong *et al.*, 2014).

Dado que SCH772984 presenta características farmacocinéticas subóptimas, lo que conlleva una baja biodisponibilidad en ratones, se desarrolló posteriormente el inhibidor MK-8353, un derivado de SCH772984 que presenta mejores propiedades farmacocinéticas para su utilización *in vivo* (Boga *et al.*, 2018). En modelos preclínicos, se comprobó que MK-8353 presenta una potencia y selectividad similar a la de SCH772984 (Moschos *et al.*, 2018). Actualmente, se está evaluando el uso de este compuesto para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos avanzados o metastásicos, entre ellos el melanoma. Así, en un ensayo clínico de fase I, MK-8353 mostró actividad antitumoral en pacientes de melanoma con mutación en *BRAF*^{V600E} (Moschos *et al.*, 2018).

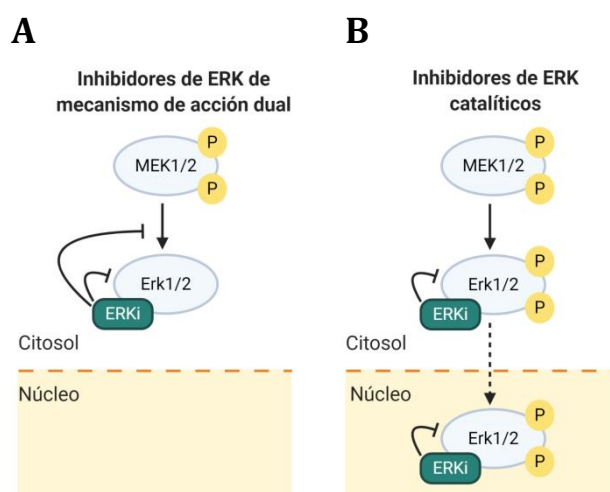


Figura 7. Mecanismo de acción de los inhibidores de ERK. (A) Los inhibidores de ERK (ERKi) de acción dual, como SCH772984, inhiben tanto la actividad quinasa como la fosforilación de Erk1/2. (B) Los inhibidores catalíticos, como el ulixertinib, bloquean la actividad quinasa de Erk1/2 y causan la acumulación de Erk1/2 fosforilado en el núcleo. (Adaptado de Kidger *et al.*, 2018).

Otro inhibidor selectivo de Erk1/2 recientemente caracterizado es ulixertinib (BVD-523) (Germann *et al.*, 2017). El desarrollo de este compuesto deriva del inhibidor Vx-11e, el cual constituyó uno de los primeros inhibidores selectivos de ERK, y ha sido ampliamente utilizado como herramienta *in vitro* y en estudios preclínicos (Aronov *et al.*, 2009). El ulixertinib inhibe el crecimiento de tumores con mutación *BRAF*^{V600E} o mutación en *KRAS* en ratones, y es efectivo en células con mutación en *KRAS* resistentes a inhibidores de MEK (Germann *et al.*, 2017). Además, ha mostrado efectos prometedores en un ensayo clínico de fase I en pacientes con tumores sólidos con mutación en *NRAS* o *BRAF*, y en tumores con *BRAF* *wild type* (Sullivan *et al.*, 2018). Este compuesto constituye un inhibidor reversible de tipo ATP-competitivo; no obstante, a diferencia de SCH772984,

no presenta un mecanismo de acción dual, sino que se trata de un inhibidor catalítico. De esta manera, el ulixertinib disminuye la fosforilación de RSK y la expresión de *DUSP6*, consistente con una inhibición catalítica de Erk1/2, pero provoca un incremento en los niveles de fosfo-Erk1/2 y su traslocación al núcleo (Germann *et al.*, 2017) (**Figura 7B**). Aunque fosfo-Erk1/2 unido a ulixertinib presenta su actividad quinasa inhibida y los niveles de fosforilación de RSK se mantienen disminuidos, se ha sugerido que la acumulación de fosfo-Erk1/2 inactivo en el núcleo podría permitir funciones independientes de su actividad catalítica. En células con mutación en *BRAF* o *RAS*, este efecto se ha relacionado con la mayor supresión de la expresión génica dependiente de Erk1/2 por inhibidores de ERK de mecanismo dual con respecto a inhibidores catalíticos (Kidger *et al.*, 2020). Además, los inhibidores de mecanismo dual como SCH772984 permiten una inhibición de Erk1/2 más potente y prolongada en el tiempo (Kidger *et al.*, 2020).

Otros inhibidores de ERK de tipo catalítico son el ravoxertinib (GDC-0994) y LY3214996, que están siendo testados en ensayos clínicos, además de los múltiples inhibidores que se encuentran en fase preclínica (Roskoski, 2019). Por tanto, existe un gran interés por conseguir inhibidores de ERK óptimos para el tratamiento del melanoma y otros tipos de cáncer.

3.4. Inmunoterapia

Paralelamente al desarrollo de los inhibidores de la vía MAPK/ERK, ha habido grandes avances en el campo de la inmunoterapia en cáncer, cuyo objetivo es la estimulación de la respuesta inmune frente al tumor. El interferón $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) fue el primer tratamiento de este tipo, aplicado como terapia adyuvante desde 1995 (Kirkwood *et al.*, 1996; Kirkwood *et al.*, 2004). Posteriormente, se aprobó la interleucina 2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma metastásico (Atkins *et al.*, 2000). No obstante, la tasa de respuesta a estas citoquinas es baja (alrededor del 15%). En los últimos años, han ganado especial interés los anticuerpos monoclonales bloqueantes del “checkpoint” inmune, especialmente los anticuerpos anti-CTLA-4 (ipilimumab) y anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) (Shtivelman *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2019). Tanto CTLA-4 como PD-1 son proteínas que se expresan en la membrana de linfocitos T y actúan como reguladores negativos de la activación de los mismos. En el caso de CTLA-4, sus ligandos CD80 y CD86 se expresan en células presentadoras de antígenos (APC), mientras que PD-L1 (ligando de PD-1) se encuentra en la superficie de algunos tipos de células tumorales, entre ellos las células de melanoma, además de expresarse en APC (Shtivelman *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2018). Por tanto, el bloqueo de estas interacciones incrementa la activación de los linfocitos T en el microambiente tumoral, favoreciendo la eliminación de las células tumorales por el sistema inmune. Hasta el momento, la inmunoterapia que ha mostrado mejores resultados en melanoma es la combinación de ipilimumab y nivolumab. Este tratamiento es efectivo en aproximadamente el 40% de los pacientes de melanoma avanzado e incrementa la supervivencia de los mismos, lo cual llevó a su aprobación en 2015 (Wolchok *et al.*, 2013; Larkin *et al.*, 2015; Wolchok *et al.*, 2017).

No obstante, alrededor del 50% de los pacientes con melanoma muestran resistencia innata o adquirida al tratamiento con inhibidores del “checkpoint” (Wolchok *et al.*, 2013; Wolchok *et al.*, 2017). Por ello, se están evaluando posibles combinaciones de

estos anticuerpos con otras terapias inmunes, así como su combinación con inhibidores de la vía MAPK/ERK. Varios estudios preclínicos sugieren que las terapias dirigidas podrían potenciar la respuesta inmune en melanoma. Así, la inhibición de MEK en células de melanoma causa un incremento de la expresión en superficie de antígenos melanocíticos (Kono *et al.*, 2006), mientras que la inhibición de BRAF en modelos *in vivo* disminuye la expresión de la quimioquina inmunosupresora CCL2 e incrementa la infiltración de células T en el tumor (Knight *et al.*, 2013). Además, la proporción de células con funciones inmunosupresoras disminuye en el microambiente tumoral tras la inhibición de BRAF (Steinberg *et al.*, 2014). En pacientes con melanoma, se han observado resultados similares, ya que el tratamiento con vemurafenib o la combinación de dabrafenib y trametinib aumenta la expresión de antígenos de melanoma y el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ en el microambiente tumoral, disminuyendo los niveles de las citoquinas inmunosupresoras IL-6 e IL-8 (Frederick *et al.*, 2013). Adicionalmente, el tratamiento con inhibidores de BRAF incrementa la sensibilidad de las células de melanoma a la citotoxicidad mediada por linfocitos T, incluso en células resistentes a terapias dirigidas (Atay *et al.*, 2019). De hecho, la combinación de dabrafenib, trametinib y anti-PD-1 mostró un incremento de la actividad antitumoral en un modelo de melanoma de ratón (Hulieskovan *et al.*, 2015). En base a estos datos, se está evaluando la eficacia y la seguridad de la triple combinación de inhibidores de BRAF y MEK con anticuerpos anti-PD-1 en varios ensayos clínicos. Resultados preliminares indican que la triple terapia puede incrementar la duración de las respuestas, aunque conlleva mayor toxicidad (Ribas *et al.*, 2019). Por ello, se ha planteado el tratamiento secuencial con ambos tipos de agentes y, actualmente, se están llevando a cabo estudios clínicos con el objetivo de determinar la secuencia más adecuada (terapia dirigida seguida de inmunoterapia, o viceversa) para el tratamiento del melanoma mutado en *BRAF*.

4. Mecanismos de resistencia a inhibidores de MAP quinasas

La combinación de inhibidores de BRAF y MEK ha incrementado la supervivencia de los pacientes de melanoma, prolongando la respuesta al tratamiento varios meses con respecto a protocolos de monoterapia, pero no ha conseguido prevenir totalmente la aparición de resistencias (Long, Stroyakovskiy *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2015). Más de la mitad de los pacientes tratados con inhibidores de BRAF o la combinación de inhibidores de BRAF y MEK adquiere resistencia durante el primer año de terapia (Long, Flaherty *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2015), y solo una minoría continúa respondiendo tras 5 años (Long *et al.*, 2018). Además, algunos pacientes con mutación en *BRAF* presentan resistencia intrínseca o primaria, es decir, no responden desde el inicio del tratamiento. Aunque la clasificación en resistencia adquirida o resistencia intrínseca es frecuentemente utilizada, la separación entre ambos tipos de resistencia no siempre es clara, y los mecanismos implicados pueden ser comunes, siendo la principal diferencia el momento en el que se presentan.

En los últimos años ha habido un gran interés en la identificación de las alteraciones moleculares responsables de la resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK. La mayoría de dichas alteraciones han sido descritas en resistencia a vemurafenib o dabrafenib (Wagle *et al.*, 2011; Rizos *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2014), aunque

posteriormente se ha observado que gran parte de éstas impiden asimismo la respuesta a trametinib o a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK (Long, Fung *et al.*, 2014). Con frecuencia, la resistencia a los inhibidores de BRAF y/o MEK se debe a la reactivación de la vía MAPK/ERK, o bien a la activación de componentes de otras rutas que permitan la supervivencia celular a pesar del bloqueo de dicha vía. Sin embargo, en algunos casos se desconocen los mecanismos de resistencia a estos inhibidores en melanoma (Long, Fung *et al.*, 2014; Rizos *et al.*, 2014).

4.1. Alteraciones en MAP quinasas y en la sensibilidad a inhibidores de la vía MAPK/ERK

Estudios con líneas celulares de melanoma identificaron una mutación puntual secundaria a la mutación BRAF^{V600E} en el dominio quinasa de BRAF (BRAF^{L505H}), la cual interfiere con la unión del vemurafenib (Wagenaar *et al.*, 2014), aunque por el momento dicha mutación no se ha observado en pacientes. En cambio, se ha detectado con alta frecuencia la amplificación génica de *BRAF* mutado en pacientes con melanoma, lo que conduce a la sobreexpresión de la proteína BRAF^{V600E} (Shi *et al.*, 2012; Rizos *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015) (**Figura 8A**). Esta amplificación causa resistencia a inhibidores de BRAF y de MEK, aunque las células resistentes muestran sensibilidad a concentraciones más altas de los fármacos que permiten inhibir los elevados niveles de BRAF activo. En pacientes con resistencia a la combinación de dabrafenib y trametinib, se ha detectado un mayor número de copias del gen *BRAF* mutado que en pacientes resistentes a monoterapia (Moriceau *et al.*, 2015). Esto sugiere que probablemente se requiera una mayor reactivación de BRAF para poder superar la inhibición combinada de BRAF y MEK. Otra alteración frecuente en pacientes con resistencia a vemurafenib consiste en la expresión de variantes aberrantes de *splicing* de *BRAF* que dan lugar a proteínas truncadas, como p61BRAF^{V600E}, la cual carece de los exones 4 al 8 (Poulikakos *et al.*, 2011; Rizos *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015). Estas proteínas BRAF truncadas carecen del dominio de unión a Ras y forman dímeros constitutivamente, incluso en presencia de bajos niveles de Ras activo, disminuyendo así la afinidad por vemurafenib (Poulikakos *et al.*, 2011) (**Figura 8B**). Las células que expresan estas variantes de BRAF mantienen la sensibilidad a la inhibición de MEK, por lo que este tipo de alteración no se suele observar en pacientes resistentes a la terapia combinada (Long, Fung *et al.*, 2014). También se han identificado con baja frecuencia pequeñas deleciones en *BRAF* (Johnson *et al.*, 2018) o fusiones génicas de *BRAF* con otros genes (Kulkarni *et al.*, 2017), las cuales dan como resultado formas de BRAF que carecen del dominio de unión a Ras y que, por tanto, son funcionalmente equivalentes a las variantes de *splicing* anteriormente mencionadas.

Por otra parte, se ha observado un incremento de expresión de CRAF por mecanismos post-transcripcionales, que permite la formación de heterodímeros BRAF-CRAF y la activación de la vía MAPK/ERK de forma dependiente de CRAF (Montagut *et al.*, 2008) (**Figura 8C**). Adicionalmente, la sobreexpresión de *MAP3K8*, que codifica para la quinasa MAP3K COT, fue descrita en modelos celulares de resistencia a vemurafenib, y posteriormente validada en muestras de pacientes (Johannessen *et al.*, 2010). COT es una quinasa que activa a ERK a través de mecanismos dependientes de MEK que no requieren señalización mediada por RAF (**Figura 8D**). Puesto que la sobreexpresión de COT confiere resistencia a inhibidores de MEK, es posible que también sea capaz de activar a ERK de forma independiente de MEK (Johannessen *et al.*, 2010).

Asimismo, se han descrito múltiples mutaciones activadoras en *MAP2K1* (MEK1) y *MAP2K2* (MEK2), como MEK1^{Q56P}, MEK1^{E203K}, MEK2^{C125S} y MEK2^{Q60P} (Emery *et al.*, 2009; Trunzer *et al.*, 2013; Van Allen *et al.*, 2014; Carlino *et al.*, 2015) (**Figura 8E**), siendo las mutaciones en *MAP2K2* las más frecuentes en resistencia a dabrafenib y trametinib (Wagle *et al.*, 2011; Villanueva *et al.*, 2013; Long, Fung *et al.*, 2014). En cuanto a ERK, fueron identificadas varias mutaciones puntuales en *MAPK3* (Erk1) y *MAPK1* (Erk2) mediante mutagénesis aleatoria en líneas celulares de melanoma, las cuales permiten la reactivación de la vía MAPK/ERK en presencia de los inhibidores de BRAF y MEK (Goetz *et al.*, 2014).

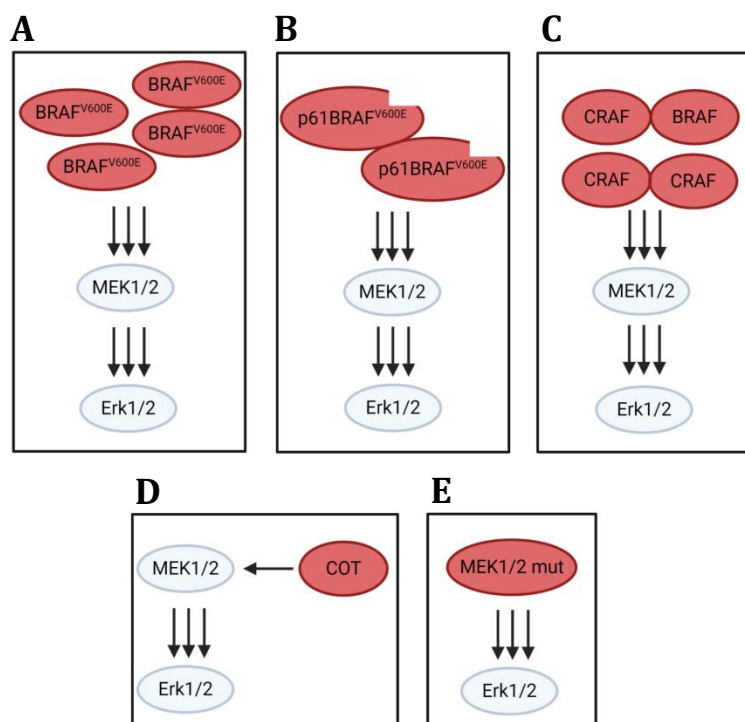


Figura 8. Resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK por alteraciones en la vía MAPK/ERK. Se muestran mecanismos de resistencia causados por la amplificación de *BRAF* mutado (A), la expresión de variantes de *splicing* de *BRAF* (B), la sobreexpresión de *CRAF* (C), la sobreexpresión de *COT* (D) y la mutación de *MEK* (E).

4.2. Alteraciones en la activación de Ras

Las mutaciones en *BRAF* y *RAS* raramente coexisten en melanoma no tratado. Sin embargo, la adquisición de mutaciones en *RAS* en melanomas BRAF^{V600E} es un frecuente mecanismo de resistencia adquirida (Rizos *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015). Las mutaciones activadoras en *NRAS* (N-Ras^{Q61K}, N-Ras^{Q61R}) promueven la estabilización permanente de la forma Ras-GTP, lo que se traduce en la reactivación de la vía MAPK/ERK en presencia de vemurafenib (Nazarian *et al.*, 2010). También han sido descritas mutaciones en *KRAS* en algunos pacientes, aunque su frecuencia es menor (Su, Bradley, *et al.*, 2012; Shi, Hugo, *et al.*, 2014). En melanoma, N-Ras mutado activa preferentemente a las proteínas CRAF (Dumaz *et al.*, 2006) y, en presencia de inhibidores de BRAF, las formas mutadas de Ras inducen la interacción de BRAF con CRAF, causando la hiperactivación de CRAF, y en consecuencia, de MEK y ERK (Heidorn *et al.*, 2010) (**Figura 9A**). Como se ha explicado previamente, el vemurafenib y el dabrafenib son únicamente efectivos frente a monómeros de BRAF^{V600E}, por lo que la formación de dímeros de RAF se asocia a resistencia al tratamiento (Poulikakos *et al.*, 2010; Karoulia *et al.*, 2016). Existe cierta

controversia en cuanto a la sensibilidad a inhibidores de MEK de las células resistentes que presentan mutaciones en *NRAS*, ya que en algunos casos la inhibición de MEK se ha mostrado efectiva (Nazarian *et al.*, 2010), mientras que en otros se ha observado una sensibilidad parcial (Gowrishankar *et al.*, 2012; Greger *et al.*, 2012). Debido a que Ras-GTP activa adicionalmente la vía de señalización PI3K/Akt, la variabilidad en la respuesta a inhibidores de MEK puede deberse a diferencias en la activación de Akt. Así, la combinación de un inhibidor de PI3K/mTOR con un inhibidor de MEK o BRAF puede tener un efecto anti-proliferativo sinérgico en células resistentes con Ras mutado (Greger *et al.*, 2012). Además, se ha descrito la sobreexpresión de la isoforma 2 de *NRAS*, que activa de forma preferente la vía PI3K en células resistentes a inhibidores de BRAF (Duggan *et al.*, 2017).

La activación de Ras también puede producirse como consecuencia de la pérdida de expresión del supresor tumoral NF1 (Whittaker *et al.*, 2013) (**Figura 9B**). La disminución de NF1 incrementa tanto la activación de la vía MAPK/ERK como de PI3K/Akt (Maertens *et al.*, 2013), reduciendo la respuesta a inhibidores de BRAF y manteniendo sensibilidad parcial a inhibidores de MEK (Whittaker *et al.*, 2013; Nissan *et al.*, 2014).

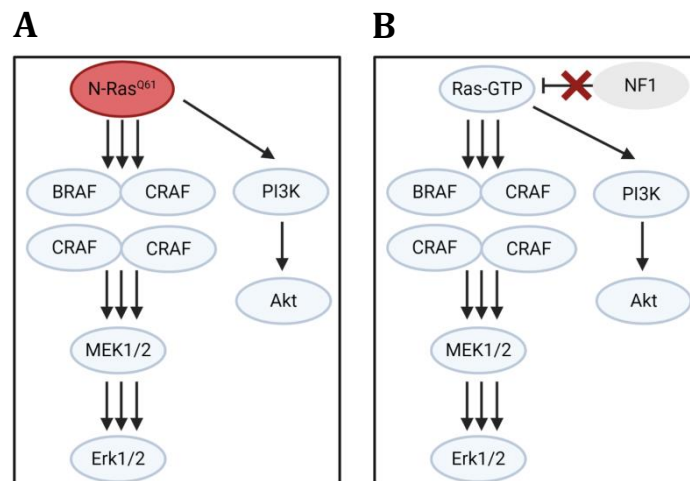


Figura 9. Mecanismos de resistencia dependientes de Ras. Se muestra la activación de Ras y de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt causada por una mutación activadora en N-Ras (A), o por la pérdida de expresión de NF1 (B).

4.3. Activación de receptores tirosina quinasa: respuesta adaptativa y resistencia

La resistencia intrínseca o adquirida a las terapias dirigidas puede estar asimismo causada por la activación de varios RTKs, puesto que éstos estimulan la señalización de la vía MAPK/ERK y de otras rutas que promueven supervivencia y proliferación celular, como la vía PI3K/Akt. Además, la activación de RTKs puede ocurrir como una respuesta adaptativa que sucede de forma temprana tras la inhibición de BRAF. Como se ha explicado anteriormente, Erk1/2 reprime de forma directa e indirecta varios componentes de la vía MAPK/ERK, regulando así el grado de activación de la vía. Por ello, la señalización a partir de los RTKs se encuentra inhibida en células de melanoma con la mutación BRAF^{V600E} (Lito *et al.*, 2012). No obstante, cuando BRAF o MEK es inhibido, la disminución de fosfo-Erk1/2 provoca la pérdida parcial de la regulación negativa de los RTKs, y la recuperación de la sensibilidad por sus ligandos y de su activación (Lito *et al.*, 2012; Lake

et al., 2016). Como consecuencia de la actividad de los RTKs, se induce la activación de Ras, la formación de dímeros BRAF-CRAF y la reactivación parcial de Erk1/2, lo que causa una disminución de la eficacia de los inhibidores en monoterapia, siendo necesarias concentraciones más elevadas de los mismos para mantener reducida la fosforilación de Erk1/2. Notablemente, la combinación de inhibidores de BRAF y MEK disminuye esta reactivación (Lito *et al.*, 2012). En algunos casos también se ha observado el aumento de la señalización de PI3K/Akt debido a la pérdida del *feedback* negativo sobre los RTKs, pudiendo tener un efecto protector frente a apoptosis (Haydn *et al.*, 2014). Generalmente, la actividad de los RTKs permanece baja en las células BRAF^{V600E} tratadas con inhibidores de la vía MAPK/ERK, lo que favorece que las células mantengan la sensibilidad al tratamiento. No obstante, la sobreexpresión o la mutación de un RTK o el incremento de los niveles de su ligando se traduce en un aumento de su actividad, provocando resistencia intrínseca o adquirida a los inhibidores de BRAF y/o MEK (Figura 10).

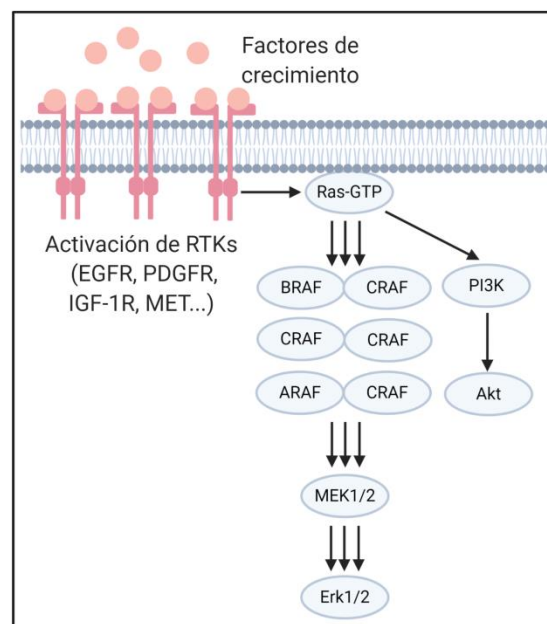


Figura 10. Resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK por la activación de receptores tirosina quinasa. Se muestra la activación de Ras y de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt, como consecuencia del incremento de expresión y/o activación de RTKs.

EGFR es un receptor para EGF y TGF- α , y constituye una molécula importante en la resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en cáncer. Por ejemplo, se ha observado que en células de cáncer colorrectal con mutación en BRAF^{V600E}, los inhibidores de BRAF no son efectivos debido a la elevada expresión basal de EGFR en estas células y a su activación tras la pérdida de la regulación negativa dependiente de Erk1/2 (Prahallad *et al.*, 2012). De forma similar, las células de melanoma pueden incrementar los niveles de EGFR y adquirir resistencia. Así, se ha descrito que la disminución del factor de transcripción SOX10 promueve la señalización de TGF- β e induce la expresión de EGFR, causando resistencia a inhibidores de BRAF (Sun *et al.*, 2014). Además de mostrar resistencia a las terapias dirigidas con inhibidores de la vía MAPK/ERK, las células de melanoma con elevada expresión de EGFR presentan mayor potencial invasivo y metastásico, mediante la activación de Src y STAT3 (Girotti *et al.*, 2013).

Tanto en modelos celulares como en pacientes de melanoma con resistencia adquirida, se ha observado la sobreexpresión de PDGFR β (Nazarian *et al.*, 2010), la cual, al igual que el aumento de expresión de EGFR anteriormente explicado, está asociada a la reducción de SOX10 y la activación de la señalización por TGF- β (Sun *et al.*, 2014). Asimismo, se ha descrito el incremento de los niveles de PDGFR α mediante la inducción del factor transcripcional GLI1 de la vía Sonic Hedgehog Homolog (Shh) (Sabbatino *et al.*, 2014). La supervivencia de las células con elevada activación de PDGFR β y PDGFR α depende, en gran medida, de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK, por lo que son sensibles a la combinación de inhibidores de PI3K/Akt y MEK (Shi *et al.*, 2011; Sabbatino *et al.*, 2014). Por otra parte, el incremento de expresión de IGF-1R en células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF promueve la activación de la vía MAPK/ERK a través de dímeros de CRAF y ARAF, así como la acumulación de fosfo-Akt (Villanueva *et al.*, 2010). Se ha propuesto que la expresión de IGF-1R puede estar inducida post-transcripcionalmente por la fosfatasa PTEN y por BRAF, de forma independiente de la actividad de MEK/ERK y de PI3K/Akt, y es estabilizada en la superficie celular por contactos con células estromales (Wang, Sinnberg *et al.*, 2015). Las proteínas IRS1/2, las cuales modulan la señalización desde IGF-1R, también se han visto aumentadas en líneas celulares derivadas de pacientes con melanoma resistentes a inhibidores de BRAF (Reuveni *et al.*, 2013).

Otras alteraciones en RTKs asociadas a resistencia incluyen la amplificación génica de *MET*, observada en pacientes con resistencia intrínseca (Krepler *et al.*, 2016), el aumento de expresión de EPHA2, perteneciente a la familia de receptores de efrinas (Miao *et al.*, 2015), así como la activación de FGFR3 (Yadav *et al.*, 2012). También se ha descrito el incremento de los niveles de Wnt5A, un ligando de la vía no canónica de Wnt, que induce la activación del receptor tirosina quinasa RYK y la activación de Akt (Anastas *et al.*, 2014).

4.4. Activación de la vía PI3K/Akt

La vía de señalización dependiente de PI3K se encuentra frecuentemente mutada en cáncer, incluyendo melanoma, y juega un papel importante en resistencia a terapias dirigidas. En humanos, existen varias isoformas de PI3K agrupadas en 3 clases (I, II y III). Las enzimas de la clase I son las más relevantes en cáncer e incluyen a PI3K α , PI3K β , PI3K γ y PI3K δ . Estas isoformas funcionan como heterodímeros constituidos por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110 α , p110 β , p110 γ o p110 δ), y una subunidad reguladora. La subunidad reguladora de 85 kDa (p85) puede asociarse a p110 α , p110 β y p110 δ , mientras que las subunidades reguladoras p101 y p84/87 se asocian a p110 γ (Fruman y Rommel, 2014; Goncalves *et al.*, 2018). Para que se produzca la activación de PI3K, es necesaria la interacción de la subunidad reguladora con residuos de tirosina fosforilados en la región citosólica de RTKs a través de dominios SH2, o bien la interacción con receptores asociados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). También pueden ser activadas mediante la interacción directa de la subunidad catalítica con Ras-GTP, siendo p110 α la principal isoforma activada por Ras oncogénico (Gupta *et al.*, 2007). PI3K en la membrana plasmática cataliza la fosforilación de su sustrato fosfatidil-inositol difosfato (PtdIns(4,5)P $_2$), para dar lugar a fosfatidil-inositol trifosfato (PtdIns(3,4,5)P $_3$), un importante segundo mensajero celular que induce el reclutamiento de proteínas con dominios PH a la membrana (**Figura 11**). La señalización por PI3K está antagonizada por el supresor tumoral PTEN, que presenta actividad fosfatasa sobre PtdIns(3,4,5)P $_3$

(Maehama y Dixon, 1998), así como por otras fosfatasa lipídicas como SHIP y INPP4B (Gewinner *et al.*, 2009; Goncalves *et al.*, 2018).

La serina/treonina quinasa Akt constituye uno de los principales efectores de la vía de PI3K (**Figura 11**). Akt es reclutada a la membrana plasmática mediante su unión a PtdIns(3,4,5)P₃, donde es fosforilada por PDK1 (Thr308 en Akt1) (Wick *et al.*, 2000). Esta fosforilación es suficiente para que Akt active al complejo mTORC1, mediante la fosforilación e inhibición de los complejos TSC que regulan negativamente a mTORC1 (Huang y Manning, 2008). Además, el complejo mTORC2 fosforila Akt (Ser473 en Akt1), permitiendo la activación total de la quinasa. mTORC1 constituye un regulador central del metabolismo celular a través de la fosforilación de varias proteínas, como las proteínas de unión al factor de iniciación de la traducción eIF4E (4EBPs) y p70 S6 quinasa (S6K), que a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6. De esta manera, se estimula la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos (Saxton y Sabatini, 2017). Además, Akt inhibe a p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, favoreciendo la entrada en el ciclo celular, y promueve supervivencia mediante la fosforilación de proteínas pro-apoptóticas como Bad o del factor de transcripción FOXO, entre otros (Fruman y Rommel, 2014).

Por otra parte, existe regulación cruzada entre las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK (Mendoza *et al.*, 2011) (**Figura 11**). Además de la activación común mediante los RTKs y Ras-GTP, se han descrito conexiones entre otros componentes de ambas vías de señalización. ERK y su sustrato RSK pueden fosforilar e inhibir a TSC2 (Ballif *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005). Asimismo, ERK y RSK fosforilan la proteína Raptor, componente del complejo mTORC1 (Carriere *et al.*, 2011), y se ha observado que la activación de mTORC1 tiene un papel fundamental en el crecimiento de células tumorales con mutación en BRAF (Komatsu *et al.*, 2015). Adicionalmente, la proteína S6 es sustrato directo de RSK (Roux *et al.*, 2007), y la quinasa MNK, otro sustrato de ERK, fosforila al factor eIF4E (Wendel *et al.*, 2007). La activación de la vía MAPK/ERK puede asimismo inhibir la vía PI3K/Akt, puesto que MEK promueve la localización de PTEN en la membrana celular (Zmajkovicova *et al.*, 2013), y ERK puede fosforilar a la proteína adaptadora Gab1 (Lehr *et al.*, 2004), disminuyendo el reclutamiento de PI3K a los RTKs activados. Por su parte, Akt puede fosforilar e inhibir a RAF (Zimmermann y Moelling, 1999), en conjunto indicando que la regulación de las vías de PI3K/Akt y MAPK/ERK está altamente entrelazada.

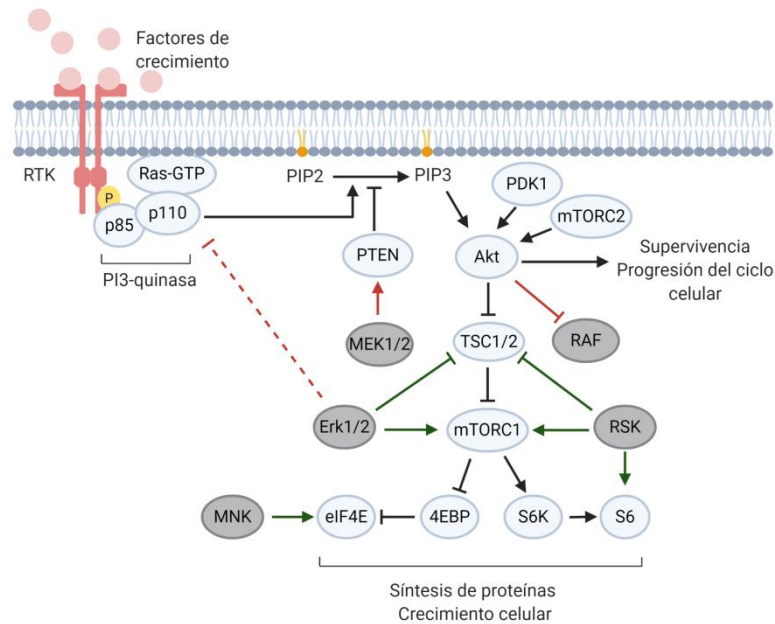


Figura 11. La ruta PI3K/Akt y sus interacciones con la vía MAPK/ERK. Esquema representativo de la señalización dependiente de PI3K en respuesta a la activación de RTKs y de Ras-GTP. Los componentes de la vía MAPK/ERK que están relacionados funcionalmente con miembros de la vía PI3K/Akt se muestran en gris. Las líneas verdes representan un efecto positivo en la activación global de la vía PI3K/Akt, mientras que las líneas rojas indican inhibición; la línea discontinua corresponde a un mecanismo indirecto de regulación. (Adaptado de Mendoza *et al.*, 2011).

En un estudio de pacientes con melanoma que presentaban resistencia a inhibidores de BRAF, se identificaron alteraciones en la vía PI3K/Akt en el 22% de los casos (Shi, Hugo, *et al.*, 2014). El incremento de activación de esta vía puede producirse como consecuencia de alteraciones en RTKs o Ras, como se ha explicado anteriormente, pero también por la mutación de algún componente de la ruta de señalización. Se han identificado mutaciones activadoras en *AKT1*, principalmente *AKT1*^{Q79K} y *AKT1*^{E17K}, en *AKT3*, así como en *PIK3CA* o *PIK3CG* que codifican las subunidades catalíticas p110 α y p110 γ de PI3K, respectivamente, y en la subunidad reguladora p85 (Shi, Hong, *et al.*, 2014; Shi, Hugo, *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2014). Por ello, niveles elevados de fosforilación de Akt permiten predecir la resistencia a la inhibición de MEK en melanoma (Catalanotti *et al.*, 2013). Por su parte, un bajo nivel de expresión de PTEN constituye un indicador de baja respuesta al tratamiento con dabrafenib (Nathanson *et al.*, 2013), ya que se traduce en la activación de Akt y en la supresión de la proteína pro-apoptótica BIM, la cual es importante en la inducción de muerte celular en respuesta a inhibidores de la vía MAPK/ERK (Paraiso *et al.*, 2011). Se ha descrito asimismo que la pérdida de PTEN conjuntamente con RB1 en melanoma reduce la dependencia de las células de melanoma de la vía BRAF/MEK (Xing *et al.*, 2012).

4.5. Otras vías implicadas en resistencia a inhibidores de las MAP quinasas

Los pacientes de melanoma que expresan mutaciones en *RAC1* muestran resistencia intrínseca a inhibidores de BRAF (Van Allen *et al.*, 2014). Esto ha sido confirmado funcionalmente, ya que *Rac1*^{P29S} confiere resistencia a la inhibición de BRAF y de MEK en líneas celulares de melanoma (Watson *et al.*, 2014), por lo que esta mutación podría ser un buen predictor de baja respuesta al tratamiento con estos inhibidores. La

expresión de Rac1^{P29S} causa resistencia mediante la activación de un programa transcripcional dependiente de SRF/MRTF y la adquisición de características mesenquimales (Lionarons *et al.*, 2019). Además, se ha descrito la implicación de las quinasas PAK, activadas por las GTPasas Rac y Cdc42, en resistencia tanto a la inhibición de BRAF como a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK (Lu *et al.*, 2017). En células con resistencia simple a inhibidores de BRAF, PAK es capaz de fosforilar a CRAF causando la reactivación de Erk1/2. Por el contrario, en doble resistencia a inhibidores de BRAF y MEK, PAK regula la fosforilación de JNK y β -catenina, activa mTOR e inhibe apoptosis, de forma independiente de la activación de Erk1/2 (Lu *et al.*, 2017). La activación de la GTPasa RhoA ha sido asimismo relacionada con resistencia adquirida a vemurafenib en células de melanoma (Misek *et al.*, 2020). Recientemente, se ha descrito que la activación de ROCK, un efector principal de RhoA, y la fosforilación por ROCK de su sustrato miosina II, promueve la supervivencia de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK, y además, induce inmunosupresión, favoreciendo así la resistencia a terapia con anticuerpos anti-PD-1 (Orgaz *et al.*, 2020).

Por otra parte, cambios en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular son frecuentes en melanoma, y pueden afectar a la eficacia de los inhibidores de BRAF y MEK. La transición de la fase G₁ de crecimiento celular a la fase S de replicación de DNA del ciclo celular se produce tras la interacción de las quinasas Cdk4/6 con las ciclinas D (D1, D2 y D3) (Satyanarayana y Kaldis, 2009; Xu y McArthur, 2016) (**Figura 12**). La expresión de las ciclinas D es inducida por Erk1/2 en respuesta a estímulos mitogénicos, y como resultado, los complejos Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D fosforilan e inactivan al supresor tumoral RB, un inhibidor de la transcripción génica dependiente del factor E2F (Otto y Sicinski, 2017). La actividad de estos complejos está regulada negativamente por p16^{INK4a}, la cual se une a Cdk4/6 e impide su interacción con la ciclina D. En la fase G₁ tardía, RB es asimismo fosforilado por los complejos constituidos por Cdk2 y ciclinas E (E1 y E2), y de esta manera, la hiperfosforilación de RB permite su disociación de E2F y la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Sheppard y McArthur, 2013; Otto y Sicinski, 2017). Entre otros, E2F induce la expresión de las ciclinas E y da lugar a un *feedback* positivo que incrementa la activación de Cdk2, mientras que la actividad de Cdk2 se encuentra controlada por p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, las cuales impiden la unión de Cdk2 a ciclina E inhibiendo su actividad (Otto y Sicinski, 2017). La amplificación de *CCND1*, que codifica para ciclina D1, se ha correlacionado con una menor respuesta a dabrafenib en pacientes con melanoma (Nathanson *et al.*, 2013). Cuando la amplificación de *CCND1* ocurre de forma simultánea a la mutación o la sobreexpresión de *CDK4*, la resistencia a inhibidores de BRAF se ve incrementada (Smalley *et al.*, 2008).

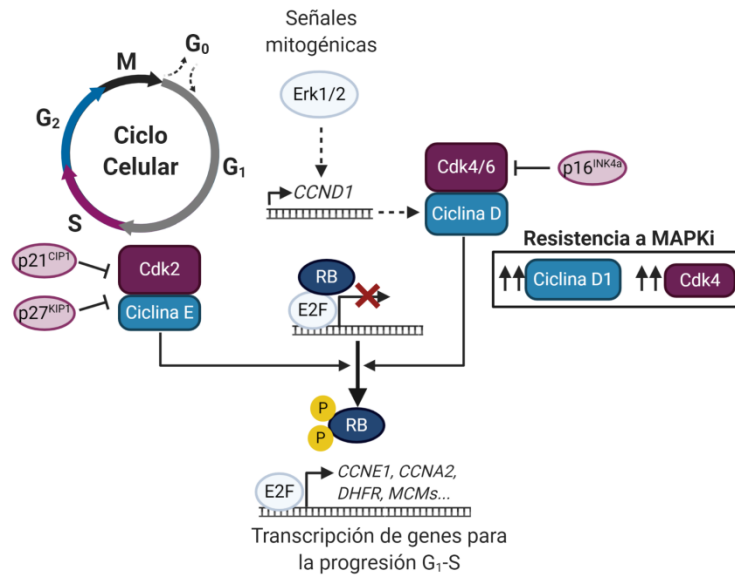


Figura 12. Regulación de la transición entre las fases G₁ y S del ciclo celular. Se muestran las fases del ciclo celular. La figura indica de forma simplificada la regulación de la entrada en fase S, mediada por los complejos Cdk4/6-ciclina D y Cdk2-ciclina E. La activación de la transcripción dependiente de E2F activa la expresión de ciclinas de tipo E (*CCNE1*) y A (*CCNA2*), entre otros genes implicados en la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA. El recuadro muestra las alteraciones asociadas a resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK (MAPKi) en melanoma, explicadas en el texto. (Adaptado de Otto y Sicinski, 2017).

Además de participar en la diferenciación de los melanocitos y en la progresión del melanoma, MITF puede estar implicado en resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK. El incremento de expresión de marcadores de linaje melanocítico, incluyendo *MITF*, ha sido descrito en células resistentes a inhibidores de esta vía (Johannessen *et al.*, 2013), observándose asimismo la amplificación de *MITF* en muestras de pacientes con melanoma resistente a vemurafenib o dabrafenib (Van Allen *et al.*, 2014). Además, MITF se ha relacionado con cambios metabólicos en células resistentes, ya que el aumento de los niveles de MITF tras la inhibición de las MAP quinasas induce la expresión de PGC1 α , promoviendo así la fosforilación oxidativa y limitando la respuesta al tratamiento (Haq *et al.*, 2013; Gopal *et al.*, 2014). Por otra parte, la resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK también se ha correlacionado con bajos niveles de MITF, particularmente acompañados de un incremento de la expresión del RTK AXL (Müller *et al.*, 2014), o con un aumento de la actividad de NF- κ B (Konieczkowski *et al.*, 2014). De esta manera, una baja expresión de MITF junto con altos niveles de AXL permite predecir la resistencia temprana al tratamiento (Müller *et al.*, 2014). En cualquier caso, los melanomas pueden presentar un fenotipo heterogéneo, con subpoblaciones de células tumorales que presentan elevada expresión de MITF y que responden al tratamiento, junto con otras células resistentes que muestran elevados niveles de AXL y mayor capacidad invasiva (Tirosh *et al.*, 2016; Arozarena y Wellbrock, 2019). Por tanto, el papel de MITF en resistencia parece ser ambivalente, y probablemente dependa de su nivel de expresión o de la presencia de altos niveles de AXL (Arozarena y Wellbrock, 2017).

Las respuestas a las terapias dirigidas también pueden verse alteradas por la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. El factor de transcripción YAP, un efector de la vía Hippo, promueve supervivencia mediante la transcripción de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL en células de melanoma con mutación en *BRAF* o *NRAS*,

reduciendo así la eficacia de los inhibidores de la vía MAPK/ERK (Lin, Sabnis *et al.*, 2015). Por otra parte, la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 se encuentra incrementada en células de melanoma que expresan BRAF^{V600E} (McKee *et al.*, 2013), y su sobreexpresión ha sido descrita en células resistentes a inhibidores de BRAF y/o MEK, asociada a niveles elevados de fosfo-Erk1/2 (Fofaria *et al.*, 2015). La proteína pro-apoptótica Noxa se une a Mcl-1 induciendo su degradación por el proteasoma, lo que favorece la muerte celular (Ploner *et al.*, 2008). La inhibición de BRAF puede disminuir la expresión de Noxa mediante la desestabilización de su transcrito, causando un aumento de Mcl-1, y por tanto, limitando la respuesta apoptótica al tratamiento (Montero *et al.*, 2019).

4.6. Microambiente tumoral y resistencia

El microambiente del tumor puede influir en la respuesta al tratamiento mediante la producción de factores que promueven la proliferación y la supervivencia de las células de melanoma. Se ha descrito que la secreción de HGF por las células estromales del tumor activa a su receptor MET en las células de melanoma, induciendo la fosforilación de Erk1/2 y Akt, y promoviendo resistencia a los inhibidores de la vía MAPK/ERK (Straussman *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha propuesto que la producción de HGF por los fibroblastos del tumor puede ser consecuencia de la activación “paradójica” de la vía MAPK causada por el vemurafenib en células BRAF *wild type* (Fedorenko *et al.*, 2015). Dicha activación potencia la producción de fibronectina y la formación de matriz extracelular, lo que se traduce en la activación de integrinas $\beta 1$ y la señalización a través de las quinasas FAK y Src en las células de melanoma, reactivando Erk1/2 e incrementando la tolerancia a los inhibidores de BRAF (Hirata *et al.*, 2015). Además, TGF- β es secretado por las células de melanoma en respuesta a la inhibición de BRAF, estimulándose la diferenciación de los fibroblastos en el tumor e incrementándose la deposición de fibronectina y la producción de NRG1, lo que finalmente contribuye a la supervivencia de las células de melanoma en presencia de vemurafenib (Fedorenko *et al.*, 2015). Por otra parte, la vía Wnt puede ser modulada por el microambiente tumoral. El antagonista de Wnt denominado sFRP2 es liberado por los fibroblastos tumorales, provocando la disminución de los niveles de β -catenina, MITF y del efector APE1, el cual presenta funciones de oxidación-reducción (Kaur *et al.*, 2016). Como resultado, se ve afectada la respuesta al daño en el DNA causado por estrés oxidativo en las células de melanoma, limitando la efectividad de los inhibidores de BRAF.

Los macrófagos presentes en el tumor pueden afectar asimismo la sensibilidad a las terapias dirigidas, por lo que la inhibición del reclutamiento y la actividad de células mieloides mediante inhibidores de CSF-1R potencia el efecto antitumoral de inhibidores de BRAF (Mok *et al.*, 2015; Ngiow *et al.*, 2016). Se ha descrito que la activación de MAP quinasas causada por el vemurafenib en los macrófagos induce la producción de VEGF, el cual a su vez estimula a sus receptores en las células de melanoma, reactivando así la señalización por Erk1/2 (Wang, Xiao *et al.*, 2015). Resultados recientes han mostrado que el tratamiento del melanoma con combinaciones de inhibidores de BRAF y MEK induce la expresión de IL-1 β y de ligandos del receptor de quimioquinas CXCR2 en nichos inflamatorios en el tumor, constituidos por macrófagos y fibroblastos (Young *et al.*, 2017). Esta respuesta interfiere con la acción de los mencionados inhibidores, por lo que el bloqueo de la señalización a través de IL-1R y CXCR2 podría incrementar la eficacia de los

inhibidores de las MAP quinasas. Además de la tolerancia al tratamiento inducida por células no tumorales del microambiente del tumor, el secretoma de las células de melanoma sensibles a vemurafenib puede favorecer el crecimiento de clones resistentes, así como su diseminación y la formación de metástasis. Este secretoma contiene factores de crecimiento como EGF e IGF, cuya expresión es inducida en respuesta al tratamiento con vemurafenib como consecuencia de la disminución de la expresión del factor de transcripción FRA1 (Obenauf *et al.*, 2015).

4.7. Alteraciones en la expresión de microRNAs

En un porcentaje significativo de melanomas resistentes a inhibidores de BRAF (26-42%) no se han identificado mutaciones que puedan explicar dicha resistencia (Shi, Hugo, *et al.*, 2014; Rizos *et al.*, 2014). Así, se ha descrito que la resistencia a terapias dirigidas en melanoma puede estar asociada a alteraciones no genómicas, las cuales implican cambios transcriptómicos y epigenéticos (Hugo *et al.*, 2015). En este sentido, la alteración de la expresión de microRNAs (miRNAs) puede contribuir a la resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK en melanoma.

4.7.1. miRNAs: biogénesis y función

Los miRNAs maduros son moléculas pequeñas de RNA monocatenario, constituidas por 22-23 nucleótidos, que regulan la expresión génica de forma post-transcripcional (Lujambio y Lowe, 2012; Bartel, 2018). En su biogénesis, los genes de los miRNAs son transcritos en el núcleo por la RNA polimerasa II, dando lugar al precursor primario de miRNA (pri-miRNA) de varios cientos de nucleótidos de longitud. Este precursor es cortado por el complejo microprocesador, constituido por la RNasa de tipo III Drosha y su cofactor DGCR8, generando así la molécula de pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos (Ha y Kim, 2014; Lin y Gregory, 2015). Tras el transporte del pre-miRNA al citoplasma mediado por la exportina-5 dependiente de RanGTP (Bohnsack *et al.*, 2004), el pre-miRNA es procesado por el complejo formado por la RNasa de tipo III Dicer y la proteína TRBP, produciendo una molécula de RNA bicatenario de 22-23 nucleótidos (Ha y Kim, 2014; Lin y Gregory, 2015). Una de las dos hebras de RNA (denominada hebra guía) constituye, junto con la proteína AGO y otras proteínas adicionales, el complejo efector miRISC (RNA-induced silencing complex), mientras que la otra hebra (designada como hebra pasajera) es generalmente degradada (Ha y Kim, 2014; Gebert y MacRae, 2019). De esta manera, la unión del miRNA maduro presente en el complejo miRISC a su mRNA diana permite que las proteínas AGO recluten factores implicados en la degradación del mRNA, o bien induce la represión de su traducción (Gebert y MacRae, 2019). Los miRNAs reconocen sus mRNAs diana mediante la complementariedad de la secuencia semilla (miRNA *seed*), constituida por los nucleótidos en las posiciones 2 a 7 en su extremo 5', con su sitio de unión comúnmente en la región 3'UTR del mRNA diana. El resto de nucleótidos del miRNA pueden contribuir al reconocimiento del mRNA diana, aunque no es necesario que sean perfectamente complementarios a éste (Bartel, 2009; Bartel, 2018). La regulación de la expresión génica mediada por miRNAs es altamente compleja, ya que un miRNA puede regular múltiples mRNAs diferentes, y un mismo mRNA puede contener varios sitios de unión para miRNAs distintos. Puesto que más de la mitad de los genes codificantes para proteínas en humanos contienen al menos un sitio de unión conservado para miRNAs (Friedman *et al.*, 2009), y

además pueden contener sitios no conservados, la expresión de la mayoría de genes codificantes para proteínas es susceptible de ser regulada por miRNAs (Bartel, 2009; Bartel, 2018).

4.7.2. miRNAs en la progresión del melanoma y en resistencia a terapias dirigidas

La participación de los miRNAs en progresión tumoral ha sido descrita en múltiples tipos de cáncer incluyendo el melanoma, pudiendo presentar tanto un papel oncogénico como de supresor tumoral. Los miRNAs oncogénicos u *oncomirs* inhiben la expresión de genes supresores tumorales, promoviendo así el crecimiento de las células neoplásicas, mientras que los miRNA supresores tumorales (*mirsupps*) bloquean el desarrollo del tumor mediante la regulación negativa de oncogenes (Lujambio y Lowe, 2012; Lin y Gregory, 2015; Varrone y Caputo, 2020). Varios estudios han mostrado cambios en los perfiles de expresión de miRNAs en líneas celulares de melanoma o en melanomas en diferentes estadios con respecto a melanocitos o nevi (Bonazzi *et al.*, 2012; Fattore *et al.*, 2017). La expresión del miRNA Let-7b, el cual regula la expresión de las ciclinas D1 y D3, y de Cdk4, disminuye en melanoma en comparación con los nevi (Schultz *et al.*, 2008), mientras que la disminución de miR-200a se correlaciona con un incremento de los niveles de su diana Cdk6 en la progresión del melanoma metastásico (Bustos *et al.*, 2017). Por otro lado, la expresión del cluster miR-221/222 incrementa con la progresión del melanoma, promoviendo la proliferación celular mediante la disminución de los niveles de p27^{KIP1} y la activación de la vía PI3K/Akt (Felicetti *et al.*, 2008; Felicetti *et al.*, 2016). Además, miR-182 inhibe la expresión de MITF y FOXO3, estimulando la invasión y la supervivencia de las células de melanoma, y promoviendo metástasis (Segura *et al.*, 2009). Otro miRNA implicado en la regulación de la invasión celular es miR-211, el cual bloquea la capacidad invasiva de células de melanoma (Levy *et al.*, 2010; Boyle *et al.*, 2011; Golan *et al.*, 2019).

Asimismo, se ha descrito que los miRNAs pueden estar implicados en resistencia adquirida a inhibidores de la vía MAPK/ERK en melanoma. MiR-514a puede modular la sensibilidad a vemurafenib en células de melanoma mediante la inhibición de la expresión de NF1 (Stark *et al.*, 2015). Adicionalmente, el aumento de los niveles de miR-125a suprime la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la vía intrínseca de apoptosis, promoviendo el desarrollo de resistencia a vemurafenib en células de melanoma (Koetz-Ploch *et al.*, 2017). Por otra parte, la reducción de los niveles de miR-7 en células de melanoma resistentes a vemurafenib induce la expresión de EGFR, IGF-1R y CRAF (Sun *et al.*, 2016) y la disminución del miR-126-3p contribuye a la resistencia a dabrafenib mediante el aumento de los niveles de VEGF-A y ADAM9 (Caporali *et al.*, 2019). Además, la expresión de BRAF y MDM2 es regulada por miR-579-3p, el cual disminuye con la progresión del melanoma y en resistencia a inhibidores de BRAF y MEK (Fattore *et al.*, 2016).

Dado su papel en el desarrollo tumoral y en resistencia a terapia en cáncer, los miRNAs constituyen dianas terapéuticas potenciales, siendo posible la inhibición de miRNAs oncogénicos, por ejemplo empleando antagonistas (*antagomiRs*), o bien el reemplazamiento de miRNAs supresores tumorales (miRNA *mimics*) (Shah *et al.*, 2016). Esta cuestión ha sido abordada en múltiples estudios preclínicos. Así, se ha mostrado que la inhibición de miR-221/222 con *antagomiRs* en melanoma reduce el crecimiento

tumoral en ratones (Felicetti *et al.*, 2008). Actualmente, varias terapias basadas en la modulación de miRNAs están siendo testadas en ensayos clínicos en pacientes con cáncer u otras patologías (Hanna *et al.*, 2019; Varrone y Caputo, 2020).

OBJETIVOS

La experiencia con inhibidores de BRAF y/o MEK en pacientes con melanoma sugiere que la adquisición de resistencia a inhibidores de ERK, tanto en monoterapia como en combinación con inhibidores de BRAF, es previsible. Asimismo, alteraciones en la expresión de miRNAs pueden limitar la eficacia de inhibidores de la vía MAPK/ERK. Resultados previos del laboratorio indican que la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p está aumentada en células de melanoma resistentes a vemurafenib, y que dichos miRNAs contribuyen a la resistencia.

- El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral fue la "Generación y caracterización de líneas celulares de melanoma con resistencia simple al inhibidor de ERK SCH772984, y con resistencia doble a vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH772984".
- El segundo objetivo ha consistido en la "Identificación de alteraciones en rutas de señalización en las células resistentes, y determinación de su implicación en las resistencias".
- El tercer objetivo se basó en el "Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib, e identificación de sus dianas proteicas".

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares de melanoma humano A375 (Giard *et al.* 1973), SK-Mel 28 y SK-Mel 103 (Carey *et al.*, 1976; Fogh *et al.*, 1977). Las células HEK293-FT fueron empleadas para la producción de lentivirus. En algunos ensayos, se utilizaron los transductantes Mel-STV-Mock y Mel-STV-BRAF^{V600E}, los cuales habían sido obtenidos previamente en el laboratorio por la Dra. Marta Díaz Martínez a partir de la línea celular de melanocitos humanos inmortalizados Mel-STV (Gupta *et al.*, 2005). Asimismo, se emplearon las células de melanoma resistentes a vemurafenib A375-VR y las células transductantes H-Scr, H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR, generadas anteriormente en el laboratorio a partir de las células A375 (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017). Las células de melanoma A375, SK-Mel 28 y SK-Mel 103 fueron cedidas por la Dra. Marisol Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid), mientras que las células HEK293-FT procedieron del Dr. Rafael Delgado (Hospital 12 de Octubre, Madrid).

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Paisley, Reino Unido), añadiéndose penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y 2 mM de glutamina (Gibco) (en adelante medio completo). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Para llevar a cabo los sucesivos pases, las células se despegaron utilizando tripsina/EDTA (Gibco) durante 5 min a 37°C.

Generación de células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK

Para la generación de células resistentes al inhibidor de Erk1/2 SCH772984 (Selleckhem, Houston, TX, EEUU), las líneas celulares A375, SK-Mel 28 y SK-Mel 103 se expusieron a concentraciones crecientes desde 0.5 nM hasta 200 nM del inhibidor. Los cultivos celulares se mantuvieron siempre en presencia del fármaco, cambiando a medio completo fresco cada 3 días. De este modo, se obtuvieron las poblaciones policlonales resistentes a SCH772984 de células A375, SK-Mel 28 y SK-Mel 103 (en adelante A375-ER, SK-Mel 28-ER y SK-Mel 103-ER). Adicionalmente, se obtuvieron clones independientes resistentes a SCH772984 generados a partir de las células A375. Para ello, las células parentales A375 se cultivaron en presencia de 200 nM del fármaco, y 3 semanas después se aislaron 24 clones resistentes, que fueron expandidos y mantenidos en medio de cultivo completo con el inhibidor.

Por otra parte, se generaron células resistentes a la combinación de los inhibidores de BRAF (vemurafenib) y de MEK1/2 (trametinib), y a la combinación de vemurafenib y SCH772984. Para ello, las células A375 y SK-Mel 28 se expusieron directamente a 1 µM de vemurafenib (PLX4032, Selleckhem) y 50 nM de trametinib (GSK1120212, Selleckhem), o bien a 1 µM de vemurafenib y 200 nM de SCH772984. Tras 4-8 semanas se obtuvieron las poblaciones policlonales de células resistentes a la combinación de vemurafenib y trametinib (en adelante A375-VR/TR y SK-Mel 28-VR/TR), y a vemurafenib y SCH772984 (A375-VR/ER y SK-Mel 28-VR/ER). Las concentraciones de los inhibidores de BRAF y MEK1/2 fueron escogidas en base al trabajo previo realizado con las líneas A375 resistentes a 1.3 µM de vemurafenib (A375-VR) y A375 resistentes a 40 nM de trametinib

(A375-TR), que fueron generadas siguiendo el mismo procedimiento que las células A375-ER (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017).

Anticuerpos, inhibidores y factores de crecimiento

Los anticuerpos utilizados para el desarrollo de este trabajo se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 2**):

Anticuerpo	Procedencia
Anti-Akt	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU)
Anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-Bcl-xL	Santa Cruz Biotechnology
Anti-BRAF	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-Cdc42	BD Biosciences (San Diego, CA, EEUU)
Anti-Cdk2	Abcam
Anti-Cdk4	Cell Signaling Technology
Anti-Cdk6	Cell Signaling Technology
Anti-Ciclina D1	BD Biosciences
Anti-c-Myc	Novus Biologicals (Littleton, CO, EEUU)
Anti-c-Raf (D4B3J)	Cell Signaling Technology
Anti-c-Src (N-16)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-DUSP6/MKP3	Cell Signaling Technology
Anti-Efrina-B2	Abcam
Anti-EGFR (A-10)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Erk1/2 (L34F12)	Cell Signaling Technology
Anti-Erk5 (dominio C-terminal)	Dra. Azucena Esparis Ogando (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Salamanca)
Anti-FAK (A-17)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfo-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-c-Raf (Ser338) (56A6)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-EGFR (Tyr1173) (9H2)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfo-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-Erk5 (Thr218/Tyr220)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-FAK (Tyr397)	BD Biosciences
Anti-fosfo-IGF-1R β (Tyr1131)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-MEK1/2 (Ser218/Ser222) (E237)	Millipore (Billerica, MA, EEUU)
Anti-fosfo-p90RSK (Thr359/Ser363)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-PAK1 (Ser199/204) /PAK2 (Ser192/197)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo-S6 (Ser235/236) (D57.2.2E)	Cell Signaling Technology

Anti-fosfo-Src Family (SFK) (Tyr419)	Cell Signaling Technology
Anti-HA.11	Biolegend (San Diego, CA, EEUU)
Anti-IGF-1Rβ (C-20)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-IGFBP5 (G-7)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MEK1 (C-18)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MITF (C5)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU)
Anti-NUAK1/ARK5	Abcam
Anti-p90RSK	BD Biosciences
Anti-PAK1/2/3 (D-8)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pan-Ras	Millipore
Anti-paxilina	BD Biosciences
Anti-PTEN (138G6)	Cell Signaling Technology
Anti-Rac1	BD Biosciences
Anti-RB	BD Biosciences
Anti-SPRED1	Caltag Medsystems (Buckingham, Reino Unido)
Anti-TGF-α	R&D Systems (Minneapolis, MN, EEUU)
Anti-Vinculina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
Anti-β-Actina	Sigma-Aldrich

Tabla 2. Anticuerpos empleados. Se indica la especificidad y la procedencia.

Los inhibidores BIX02189, erlotinib, lapatinib, linsitinib (OSI-906), palbociclib (PD0332991), saracatinib (AZD0530), trastuzumab, tricitiribina y Vx-11e se obtuvieron de Selleckchem. MIM1 fue obtenido de Calbiochem (San Diego, CA, EEUU). El inhibidor eCF506 fue cedido por el Dr. Asier Unciti Broceta (University of Edinburgh, Reino Unido), y la tapsigargina por la Dra. Natalia Rodríguez Muela (Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid).

Los factores de crecimiento recombinantes humanos VEGF y PDGF-AA fueron obtenidos de Peprotech (Londres, Reino Unido), y TGF- α de Stemcell Technologies (Vancouver, Canada).

Vectores de expresión y RNA de interferencia

En este trabajo se emplearon los vectores pcDNA3.1-HA-MEK5-AA, el cual fue generado en el laboratorio de la Dra. Azucena Esparis, y pcDNA3.1-V5-His A-DUSP6, que fue cedido por el Dr. Toru Furukawa (Tohoku University Graduate School of Medicine, Japón). El vector pcDNA3.1 vacío utilizado como control se obtuvo de Invitrogen (Paisley, Reino Unido).

Para realizar el silenciamiento génico estable de Erk5, se emplearon los vectores lentivirales pLKO.1-shERK5#62 y pLKO.1-shERK5#75, así como el control negativo pLKO.1-shControl, cedidos por la Dra. Azucena Esparis. Los plásmidos pRSV/Rev,

pMDLg/pRRE y pMD2.G/VSV necesarios para la producción de lentivirus procedieron de Addgene (Watertown, MA, EEUU).

En la **Tabla 3** se presentan las secuencias de los siRNAs utilizados para silenciar de forma transitoria la expresión de diferentes proteínas.

siRNA	Hebra sentido	Hebra complementaria	Procedencia
BRAF	GGAGGUGUGGAAUAUCAAAdTdT	UUUGAUUAUCCACACCUCCdTdT	Ambion (Foster City, CA, EEUU)
Cdk2	GCACGUACGGAGUUGUGUAdTdT	UACACAACUCCGUACGUGCdTdT	Sigma- Aldrich
Cdk4 SMARTpool	siRNA#1 CAAGGUAACCCUGGUGUUdTdT	siRNA#1 AAACACCAGGGUUACCUUGdTdT	Dharmacon (Lafayette, CO, EEUU)
	siRNA#2 GAGCUCUGCAGCACUCUAdTdT	siRNA#2 UAAGAGUGCUGCAGAGCUCdTdT	
	siRNA#3 CAGCACAGUUCGUGAGGUGdTdT	siRNA#3 CACCUCACGAACUGUGCUGdTdT	
	siRNA#4 GCACUACACCCGUGGUUGdTdT	siRNA#4 CAACCACGGGUGUAAGUGCdTdT	
Cdk6	GUUUGUAACAGAUAUCAUdTdT	AUCGAUAUCUGUUACAAACdTdT	Sigma- Aldrich
Control	AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTdT	GUCUGCGAUCGCAUACAAUdTdT	Sigma- Aldrich
IGFBP5	AGAAAGCAGUGCAAACCUdTdT	AAGGUUUGCACUGCUUUCUdTdT	Ambion
MITF SMARTpool	siRNA#1 UGGCUAUGCUUACGCUAAAdTdT	siRNA#1 UUAAGCGUAAGCAUAGCCAdTdT	Dharmacon
	siRNA#2 AGAACUAGGUACUUUGAUdTdT	siRNA#2 AAUCAAAGUACCUAGUUCUdTdT	
	siRNA#3 AGACGGAGCACACUUGUAdTdT	siRNA#3 UAACAAGUGUGCUCCGUCU	
	siRNA#4 GAACACACAUUCACGAGCGdTdT	siRNA#4 CGCUCGUGAAUGUGUGUUCdTdT	
PAK1	GAAGAAUAUACACGGUUdTdT	AAACCGUGUAUAUUUCUUCdTdT	Sigma- Aldrich
PAK2	AGAAGGAACUGAUCAUUAAdTdT	UUAUGAUCAGUCCUUCUdTdT	Sigma- Aldrich
PAX6 SMARTpool	siRNA#1 CCAAGCGUGUCAUAUAAdTdT	siRNA#1 UUAUUGAUGACACGCUUGGdTdT	Dharmacon
	siRNA#2 GGCAAUCGGUGGUAGUAAAdTdT	siRNA#2 UUUACUACCACCGAUUGCCdTdT	
	siRNA#3 GUGCGACAUUCCCGAAUdTdT	siRNA#3 AAUUCGGGAAAUGUCGCACdTdT	
	siRNA#4 AACCUGAUUGUCUCAAUAdTdT	siRNA#4 UAUUGAGACAUUCAGGUUdTdT	
STAT3	GGCUGGACAAUAUCAUUGAdTdT	UCAAUGAUUUGUCCAGCCdTdT	Sigma- Aldrich

Tabla 3. siRNAs utilizados para el silenciamiento transitorio de diferentes proteínas. Se indican las secuencias y la procedencia.

Transfecciones transitorias

En las transfecciones transitorias con siRNAs se empleó el reactivo Interferin (Polyplus-transfection, Illkirch, Francia), mientras que para los vectores de expresión se utilizó el reactivo JetPRIME (Polyplus-transfection), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, el día previo a la transfección, las células fueron sembradas de forma que la confluencia fuera del 50-60% en el momento de la transfección. La concentración

final de los siRNAs fue de 40 nM, y en el caso de los vectores de expresión, se utilizaron 10 µg de DNA. Tras 48-72 horas, en función del experimento, se determinó la eficiencia de la transfección analizando el nivel de expresión de las proteínas o de los mRNAs correspondientes mediante *western blot* o qPCR, respectivamente. Dependiendo del experimento, los diferentes transfectantes fueron analizados en ensayos de viabilidad o proliferación celular.

Silenciamiento génico estable mediante transducción lentiviral

Para la producción de lentivirus se utilizó el sistema lentiviral de tercera generación, basado en el empleo de tres vectores: pMD2.G-VSV, codificante para las proteínas de la envoltura, y los plásmidos pRSV-Rev y pMDLg/pRRE necesarios para la retrotranscripción viral y la formación de la cápside. La línea celular HEK293-FT fue cotransfectada con 10 µg de los vectores pLKO.1-shERK5#62, pLKO.1-shERK5#75 o pLKO.1-shControl, los cuales codifican para resistencia a puomicina, junto con 3 µg de cada uno de los mencionados vectores pMD2.G-VSV, pRSV-Rev y pMDLg/pRRE. Las transfecciones se realizaron con lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las diferentes combinaciones de vectores se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con lipofectamina, la cual fue previamente diluida con medio DMEM sin FBS y mantenida a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, las células HEK293-FT fueron incubadas durante 6-8 horas con esta mezcla de transfección en DMEM sin suero, y dicho medio fue reemplazado posteriormente por medio completo. Tras 48 horas, se recogió y filtró el sobrenadante de dichas células empleando filtros de un tamaño de poro de 0.45 µm. Este medio conteniendo los virus fue añadido a las células A375-ER en una relación 1:1 (volumen de medio con virus: volumen de medio completo fresco), en presencia de 8 µg/ml de polibreno (Millipore). La transducción se llevó a cabo durante 72 horas, tras lo cual el medio fue sustituido por medio completo fresco y se procedió a la selección de los transductantes mediante el tratamiento con puomicina (1 µg/ml; Sigma-Aldrich). Tras el crecimiento de clones de células resistentes a puomicina, se determinó la eficiencia del silenciamiento génico mediante *western blot* y qPCR. Los transductantes estables se mantuvieron en cultivo en presencia de 0.5 µg/ml de puomicina.

Western blotting

Para los ensayos de *western blotting*, las células fueron cultivadas en medio completo. Una vez aspirado el medio de cultivo, las células fueron lisadas a 4°C directamente en adhesión sobre la placa de cultivo, utilizando la solución de lisis TNN (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) suplementada con cócteles de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Basilea, Suiza) y de fosfatasa (phosSTOP, Roche). A continuación, los lisados celulares se mantuvieron 20 minutos a 4°C o bien se congelaron a -20°C, y posteriormente fueron centrifugados a 4°C durante 15 min a velocidad máxima (16000 x g). La concentración de proteínas en el sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU), y el volumen de lisado conteniendo 50-100 µg de proteína fue incubado a 100°C durante 5 minutos en solución de carga (10% SDS, 50% Glicerol, 100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% de azul de bromofenol). Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida entre el 8 y el 15%, según el tamaño de las

proteínas a analizar, en presencia de SDS (SDS-PAGE), y posteriormente electrotransferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (3% de BSA en TBS con 0.1% de Tween-20), e incubadas durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo. Tras realizar tres lavados con 0.1% de Tween-20 en TBS, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EEUU). Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces con 0.1% de Tween-20 en TBS y las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el sustrato Immobilon Western (Millipore) en el detector ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories). En algunos casos, las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría con el software ImageJ. Los niveles de expresión de las proteínas de interés fueron normalizados utilizando vinculina o β -actina como control de carga, mientras que para el análisis de la fosforilación de proteínas, el nivel de proteína fosforilada fue referido a la expresión total de la misma.

Cuando fue necesario, se liberaron los anticuerpos unidos a las membranas para volverlas a incubar con otros anticuerpos primarios diferentes. En estos casos, las membranas se trataron durante 1.5 horas a temperatura ambiente con solución de *stripping* (1% Glicina, 1% SDS, 0.05% Nonidet P-40, pH 2.2), y posteriormente fueron lavadas con 0.1% de Tween-20 en TBS, bloqueadas e incubadas de nuevo con anticuerpos primarios, siguiendo el procedimiento descrito más arriba.

Ensayos de actividad GTPasa (*pull-down*)

El vector codificante para la proteína de fusión GST-RAF-RBD, que es capaz de unirse a las formas de Ras activas, fue cedido por el Dr. Johannes L. Bos (University Medical Center Utrecht, Países Bajos). Por otra parte, para la detección de Rac1-GTP y Cdc42-GTP se empleó la proteína de fusión GST-PAK-CD, proporcionada por el Dr. John G. Collard (The Netherlands Cancer Institute, Ámsterdam, Países Bajos). Las proteínas de fusión fueron generadas según el procedimiento previamente descrito (Sander *et al.*, 1998). Las células se cultivaron en medio completo, y posteriormente fueron lisadas adheridas a la placa de cultivo en solución de lisis TNN (anteriormente especificada) suplementada con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche). Los lisados fueron mantenidos a 4°C durante 20 min, siendo centrifugados a continuación a velocidad máxima durante 15 min a 4°C. Tras la cuantificación proteica de los sobrenadantes mediante el método de Bradford, se separaron 30-40 μ g de proteína y se prepararon para SDS-PAGE como control de carga del lisado total. Las proteínas de fusión fueron incubadas con *beads* de glutatión-sefarosa (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) durante 2 horas a 4°C en rotación, permitiendo así la unión de la proteína de fusión a las *beads*. La proteína de fusión no unida fue eliminada mediante tres lavados con solución de lisis TNN seguidos de centrifugaciones a baja velocidad (400 x *g*) a 4°C. A continuación, las *beads* unidas a la proteína de fusión fueron incubadas durante 16 horas a 4°C en rotación con los lisados celulares que contenían 1 mg de proteína total. Posteriormente, las *beads* fueron lavadas y centrifugadas, y las muestras se hirvieron a 100°C durante 10 min en solución de carga para eluir las proteínas unidas a GTP que habían interactuado con la proteína de fusión. Finalmente, las muestras se resolvieron en geles del 12% de poliacrilamida en presencia de SDS, y fueron transferidas a membranas de PVDF.

Siguiendo el protocolo de *western blotting* anteriormente descrito, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios para la detección de las proteínas Ras, Rac1 y Cdc42. El nivel de activación de Ras, Rac1 y Cdc42 en las muestras procedentes del ensayo *pull-down* fue cuantificado y referido a la expresión total de dichas proteínas en el lisado celular.

Ensayos de viabilidad celular

Para determinar el efecto de diferentes compuestos sobre la viabilidad celular, se evaluó la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, empleando como sustrato el reactivo MTT (Sigma-Aldrich). Las células (2×10^3 , 5×10^3 o bien 8×10^3 para ensayos de 72 horas, 48 horas o 24 horas, respectivamente) fueron sembradas por triplicado y en medio de cultivo completo en placas de 96 pocillos. Tras 16 horas, se añadieron los tratamientos correspondientes en un volumen final de 150 μ l, sustituyendo el medio de cultivo por medio DMEM sin FBS en el caso de los ensayos de 24 horas. Estos últimos se llevaron a cabo en experimentos de silenciamiento de la expresión de Cdk4, Cdk4/2 o Cdk4/6, en los cuales la recuperación de la expresión de dichas proteínas no permitió la realización de ensayos de viabilidad de 48 horas. Transcurrido el tiempo del tratamiento, se añadieron 10 μ l de una solución de MTT (0.5 mg/ml en PBS) a las células, las cuales fueron incubadas durante 1.5 horas a 37°C. Posteriormente, el medio de los pocillos fue eliminado y los cristales de formazán obtenidos se solubilizaron con 200 μ l de DMSO. La absorbancia del color resultante se midió en un lector de placas a 540 nm (Titertek Multiskan Plus MKII).

Ensayos de proliferación celular

Los ensayos de proliferación celular se realizaron con el reactivo Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Sigma-Aldrich), que se basa en la actividad de enzimas deshidrogenasas en las células metabólicamente activas. A diferencia del MTT, este reactivo da lugar a un producto soluble en el medio de cultivo y que puede ser detectado con alta sensibilidad. Para ensayos de 48 horas, se sembraron 8×10^3 células en cuádruplicado y en medio completo en placas de 96 pocillos, y se incubaron durante 4-5 horas para permitir la adhesión de las células a la superficie de la placa. A continuación, los compuestos fueron añadidos en un volumen final de 100 μ l del mismo medio y las células viables se cuantificaron al inicio del tratamiento (tiempo 0 horas), y a las 16, 24, 40 y 48 horas. Para ello, se añadieron 5 μ l del reactivo CCK-8 a las células, las cuales se incubaron durante 2 horas a 37°C. En el caso de ensayos de 7 días, 200 células fueron depositadas en cuádruplicado y en medio completo en placas de 96 pocillos, añadiéndose el reactivo CCK-8 al inicio del tratamiento (0 horas) y cada 24 horas. El producto resultante de la reacción colorimétrica se cuantificó por absorbancia a 450 nm en el lector Titertek Multiskan Plus MKII.

Ensayo de formación de colonias en *Soft Agar*

La capacidad de proliferación de las células de melanoma independientemente de su adhesión a un sustrato se determinó mediante ensayos de crecimiento en geles tridimensionales de agarosa. Para ello, se preparó agarosa al 1% en PBS a 40°C, se diluyó con medio DMEM 2x con 20% de FBS, y se dejó polimerizar posteriormente durante 30 minutos a 37°C en placas de 6 pocillos, obteniéndose así una capa de agarosa al 0.5%.

Sobre esta capa se generó un segundo gel de agarosa al 0.35% conteniendo el cultivo celular, mezclando DMEM 2x/FBS 20% con agarosa al 0.7% a 40°C, y con 5×10^4 células, dejando finalmente polimerizar la mezcla a 37°C durante 30 min. Las células fueron sembradas en triplicado para cada condición y el medio de cultivo fue reemplazado 2-3 veces por semana con medio completo fresco en ausencia o presencia del inhibidor de Erk1/2. Tras 3 semanas de cultivo, los geles se lavaron con PBS y las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente fueron lavadas con PBS. Las células se tiñeron con una solución de cristal violeta, y tras sucesivos lavados con agua, el número de colonias con un diámetro superior a 50 μm en cada condición fue determinado por microscopía de campo claro.

Ensayo de formación de melanosferas

Siguiendo el protocolo descrito por Contador-Troca *et al.*, (2015), las células (3×10^4) fueron sembradas en placas de 24 pocillos de baja adhesión (Costar Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate, Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, EEUU), y cultivadas en una mezcla 1:1 de DMEM sin FBS y medio condicionado, previamente obtenido de un cultivo de 48 horas. Tras 24 y 48 horas de cultivo, las melanosferas fueron visualizadas con un microscopio de campo claro, y fotografiadas con un objetivo 10x acoplado a una cámara AxioCam ERc5s (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Ensayo de crecimiento de esferoides 3D

El cultivo de esferoides constituye un modelo celular *in vitro* ampliamente utilizado para evaluar la respuesta de células tumorales a compuestos farmacológicos. En este trabajo, se llevó a cabo la formación de esferoides de células de melanoma mediante el sistema Cultrex 3-D Spheroid Colorimetric Proliferation/Viability Assay (R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 2×10^3 células A375, A375-ER y A375-VR/TR se sembraron en cuadruplicado en presencia de las proteínas de matriz extracelular proporcionadas por el kit, sobre placas óptimas para el cultivo 3D (3D Culture Qualified 96 Well Spheroid Formation Plate; R&D Systems). Tras 48 horas de cultivo, momento en el que los esferoides alcanzaron aproximadamente 400-500 μm de diámetro, se añadió el inhibidor linsitinib en medio completo. Los esferoides fueron fotografiados el día de inicio del tratamiento (día 0) y cada 24 horas, mediante un estereomicroscopio Leica MZ16 F. El área de los esferoides fue cuantificada utilizando el programa ImageJ, y normalizada al día 0 de tratamiento para cada esferoide. Al final del ensayo, la viabilidad celular de los esferoides se determinó colorimétricamente mediante el reactivo MTT proporcionado por el kit.

Ensayo de invasión celular a través de Matrigel

Para los ensayos de invasión celular, se emplearon cámaras de invasión con filtros con un tamaño de poro de 8 μm (Corning Life Sciences), las cuales fueron tapizadas con 35-40 μl de una dilución 1:3 de Matrigel (BD Biosciences) en medio de invasión (0.5% de BSA en DMEM sin suero). Las células fueron despegadas con PBS-EDTA 2 mM y resuspendidas (6×10^4) en 200 μl de medio de invasión. A continuación, las células fueron depositadas en duplicado en los compartimentos superiores de la cámara de invasión, mientras que en los inferiores se añadieron 700 μl de medio de invasión en presencia de 10% de FBS. Tras 48 horas de incubación a 37°C, se retiraron las células no invasivas y los

restos de Matrigel de la parte superior de la cámara, y las células invasivas adheridas a la parte inferior del filtro fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras realizar dos lavados con PBS, las células invasivas se tiñeron con solución de cristal violeta y se contaron empleando un microscopio de campo claro.

Microscopía confocal

Las células fueron sembradas (1×10^4 - 2×10^4) en cámaras de 12 pocillos (Ibidi, Gräfelting, Alemania) previamente tapizadas con fibronectina humana (10 µg/ml) en NaHCO_3 0.1 M, pH 8.8. Tras 16 horas de cultivo a 37°C, las células se fijaron y permeabilizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de PBS que contenía 1% de paraformaldehído y 0.1% de Tritón X-100. A continuación, las células fueron lavadas tres veces con PBS, expuestas a la solución de bloqueo (3% de BSA en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente incubadas a 4°C durante 16 horas con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Tras lavar varias veces con PBS, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con solución de bloqueo conteniendo faloidina conjugada con FITC (Invitrogen) y los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS, y las muestras se montaron con ProLong Diamond Antifade Mountant en presencia de DAPI (Invitrogen). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal láser Leica TCS-SP5 con un objetivo 63x de inmersión de aceite.

Análisis mediante *arrays* de la fosforilación de receptores tirosina quinasa

Para determinar el nivel de fosforilación de 49 receptores tirosina quinasa en las células A375 y A375-ER, se empleó el kit Human phospho-Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Array (R&D Systems). Estas células fueron cultivadas durante 24 horas en medio completo en ausencia de SCH y los lisados fueron preparados mediante la solución de lisis proporcionada por el fabricante, de acuerdo con el procedimiento detallado anteriormente para *western blotting*. A continuación, se añadieron 300 µg de proteína total a las membranas de nitrocelulosa que contenían los anticuerpos anti-RTK, previamente bloqueadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 16 horas de incubación en agitación a 4°C, las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo anti-fosfo-tirosina-HRP durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras realizar lavados y añadir el sustrato quimioluminiscente, los receptores tirosina quinasa fosforilados se visualizaron utilizando el detector ChemiDoc Imaging System. Finalmente, los puntos resultantes fueron densitometrados empleando la aplicación ImageJ. En cada membrana, se sustrajo la señal de fondo inespecífica y el valor promedio de cada duplicado de puntos fue normalizado con respecto al promedio de los controles positivos, utilizados como control de carga del lisado celular.

Análisis mediante *arrays* de la expresión de factores de crecimiento

La detección de factores de crecimiento en el sobrenadante de las células en cultivo se realizó mediante el kit Human Growth Factor Antibody Array (Abcam), basado en el uso de membranas que contienen anticuerpos para el reconocimiento de 41 factores de crecimiento humanos. Las células A375 y A375-ER se cultivaron en medio completo en

ausencia de SCH, y tras 48 horas, el medio de cultivo fue centrifugado durante 5 minutos a 300 x *g* para precipitar posibles restos celulares. Siguiendo el protocolo del fabricante, los sobrenadantes se añadieron a las membranas y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con un cóctel de anticuerpos anti-factores de crecimiento y anti-citoquinas conjugados con biotina. Tras realizar los lavados correspondientes, se añadió estreptavidina conjugada con HRP, y después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las membranas se lavaron de nuevo, procediéndose finalmente a la detección de la quimioluminiscencia con el equipo ChemiDoc Imaging System. Para la cuantificación de los resultados, se llevó a cabo el procedimiento anteriormente descrito para el *array* de receptores tirosina quinasa fosforilados. Para la detección de IGFBP5 en el sobrenadante de las células, éstas fueron cultivadas durante 48 horas en las mismas condiciones que para el análisis de expresión de factores de crecimiento mediante *arrays*, y posteriormente se recogieron 500 µl del sobrenadante del cultivo, el cual fue concentrado empleando columnas Vivaspin 500 10,000 MWCO PES (Sartorius, Gotinga, Alemania), y analizado por *western blotting*.

Análisis del ciclo celular

Para la obtención de los perfiles del ciclo celular, se sembraron 1.2x10⁵ células en placas de 6 pocillos. Al cabo de 16 horas, se añadieron los tratamientos correspondientes, y tras 48 horas, las células fueron tripsinizadas, tomándose 5x10⁵ células por condición, las cuales fueron fijadas con etanol al 70% durante 10 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron con BSA al 2% en PBS, y posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en 500 µl de solución de yoduro de propidio (PI/RNASE Solution; Immunostep, Salamanca). Tras 15 minutos de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, los perfiles de ciclo celular se obtuvieron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman-Coulter, Brea, CA, EEUU). El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determinó utilizando el programa de análisis FlowLogic (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania).

Ensayo de apoptosis celular

Las células se incubaron durante 96 horas en ausencia o en presencia del inhibidor de Erk1/2. Para cuantificar la apoptosis inducida por el tratamiento, se recogieron tanto las células en suspensión como las adheridas a la superficie de la placa de cultivo, y 2x10⁵ células totales fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 300 µl de solución de Anexina V con 1.5 µl de Anexina V-FITC, siguiendo las instrucciones del fabricante (Immunostep). Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, se añadió yoduro de propidio (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) y se procedió inmediatamente a analizar las muestras en el citómetro de flujo Coulter Epics XL.

Transcripción inversa y PCR cuantitativa (qPCR)

Las células se lisaron en adhesión con el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich), y el RNA fue aislado mediante la adición de cloroformo, y posteriormente precipitado con isopropanol. El RNA se resuspendió en agua libre de RNasas y fue cuantificado por absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Para la retrotranscripción a cDNA, se emplearon 2 µg de RNA, hexámeros

aleatorios de desoxinucleótidos (Roche), dNTPs (Roche) y la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EEUU), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante de la enzima.

La PCR cuantitativa fue llevada a cabo por triplicado. El cDNA obtenido fue diluido cuatro veces, empleándose 2.5 µl de la dilución junto con el reactivo FastStart Essential DNA Green Master (Roche) y oligonucleótidos específicos para cada transcrito a amplificar (200 nM; **Tabla 4**). El reactivo FastStart Essential DNA Green Master contiene la Taq DNA polimerasa FastStart y el fluoróforo SYBR Green I. Este fluoróforo se une al DNA de doble cadena, de manera que la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR. El resultado obtenido es el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar un umbral de fluorescencia establecido o *threshold* (Ct), siendo este valor inversamente proporcional a la cantidad inicial de DNA en la reacción.

Oligonucleótido	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
CCND1	GATCAAGTGTGACCCGGACTG	CCTTGGGGTCCATGTTCTGC
CCNE1	CGCAGGGAGCGGGATG	GGGTCTGCACAGACTGCAT
CDK2	ATCTTTGCTGAGATGGTGACTC	CACTTGGGGAAACTTGGCTTG
CDK4	TTGGCAGCTGGTCACATGGT	TCAGATCAAGGGAGACCCTCAC
CDK6	TGCAGGGAAAGAAAAGTGCAATG	TCCTCTTCCCTCCTCGAAGC
CDKN1A	TGACATGGCGCCTCCTCT	CCGAAGTCAGTTCCTTGTGGA
c-JUN	GCTCTGTTTCAGGATCTTGGGGTTAC	TTCTATGACGATGCCCTCAACGC
c-MYC	GAAGCCGCTCCACATACAGT	AGAGTTTCATCTGCGACCCG
DUSP5	TCGTCTCACCTCGCTACTC	AGTCTCATATCCCCCTTTGAGGA
DUSP6	CTGGAACGAGAATACGGGCG	CTTACTGAAGCCACCTTCCAGG
EGFR	ACTATGTCCCGCCACTGGAT	TTTACAGGAAATCCTGCATGGC
GAPDH	GCCAATACGACCAAATCC	AGCCACATCGCTCAGACAC
IGF1R	ACGTGCTTGGGCACATTTTC	GCCGATGTGTGAGAAGACCA
IQGAP1	AGGCAAGCAAACCTGCCCTAT	CTGATGGAGCTGTCTAGCCG
KSR1	ATGTAAAGCCTGGCAGTCCC	CAGTCACCTAGTATCAGCAGCC
KSR2	TCATCCACCGAGGAGATCCA	GGCTTCCGTAGAGGGTTGTT
MITF	ATGGCAAATACGTTGCCTGTC	GTGAGCTCCCTTTTTATGTTGGG
NF1	GCCTGGCTCAGAATTCACCT	CAATGCGGAATTGGTGATGATTC
PAK1	TCCCACGAGGTAACGTGCCA	CAGGAGGTGGCCATTAAGCA
PAK2	AGGAGGTGCTGGAGGCTTAT	TTGCCCCGGGGCCATTTTATA
PAK3	TGGGAAGTGGTTTGGAGCTG	CAACATGGAATGACTTGAGGAGC
PAX6	CTTCGCTAATGGGCCAGTGA	TCAGATTCCCTATGCTGATTGGTGA
SPRED1	GTGCATAACTATTATCGTTGTCAGA	CAGATCGGATCACGGTGAGG
STAT3	GAAACAGTTGGGACCCCTGA	AGGTACCGTGTGTCAAGCTG
TBP	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA
TRPM3	CAGAATCAGTGCTCAGGCTCA	GAAGCACGGAGATACTGGGG
TYR	AGATTCAGACCCAGACTCTTTTCA	GACACAGCAAGCTCACAAGC
TGFA	GAATGGCAGACACATGCTGG	GGTATTGTGTTGGCTGCGTG

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qPCR. Se indican el gen diana y las secuencias sentido y antisentido de cada pareja de oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

La reacción de amplificación del cDNA se llevó a cabo en el termociclador LightCycler 480 (Roche), con el protocolo indicado en la **Tabla 5**.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización y activación de la enzima	95°C	5 min
Desnaturalización	95°C	10 s
Anillamiento y extensión	60°C	30 s
Enfriamiento	4°C	-

Tabla 5. Programa de PCR empleado en los ensayos de qPCR para el análisis de expresión de mRNAs.

Para el análisis de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, se realizaron ensayos de qPCR empleando sondas específicas TaqMan. Las células fueron lisadas con el reactivo QIAzol (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y el RNA fue extraído con el kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen), el cual permite purificar el RNA total incluyendo RNA de pequeño tamaño. A continuación, se emplearon 12.5 ng de RNA para la obtención de cDNA, utilizando oligonucleótidos específicos para la transcripción inversa de cada miRNA analizado (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y los reactivos de TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo en triplicado empleando 1 μ l del producto de la transcripción inversa, oligonucleótidos específicos para cada miRNA (TaqMan MicroRNA Assay), y el reactivo FastStart Essential DNA Probes Master que contenía la Taq DNA polimerasa (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La tecnología de sondas TaqMan está basada en sondas que se unen específicamente a secuencias complementarias localizadas entre los sitios de unión de los oligonucleótidos sentido y antisentido en el gen diana. Estas sondas contienen un reportero fluorescente en el extremo 5' y un *quencher* no fluorescente en el extremo 3', de manera que durante la extensión del cDNA, la Taq DNA polimerasa corta la sonda por el extremo 3' liberando el *quencher*, permitiendo así la emisión de fluorescencia por el reportero situado en el extremo 5'. De este modo, como en el caso de la qPCR basada en SYBR Green I, la señal fluorescente emitida es directamente proporcional a la cantidad de cDNA amplificado. La reacción de PCR se realizó en el termociclador LightCycler 480, siguiendo el protocolo indicado en la **Tabla 6**.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización y activación de la enzima	95°C	10 min
Desnaturalización	95°C	15 s
Anillamiento y extensión	60°C	60 s
Enfriamiento	4°C	-

Tabla 6. Programa empleado en los ensayos de qPCR para el análisis de expresión de miRNAs.

El análisis de los resultados se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$. Brevemente, para cada muestra se calculó la diferencia entre los valores C_t (ΔC_t) del gen de interés respecto al gen de referencia (*GAPDH* o *TBP* para mRNA; *RNU44* para miRNA). A continuación, se obtuvo la diferencia entre los valores ΔC_t de cada muestra analizada y de la muestra establecida como referencia en cada experimento ($\Delta\Delta C_t$), y el resultado se representó como expresión relativa o *fold change* del gen de interés entre las muestras ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Secuenciación de DNA

El RNA de las muestras fue extraído y retrotranscrito a cDNA siguiendo la metodología descrita anteriormente. A continuación, el cDNA se amplificó por PCR convencional, empleando la Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones en donde se localizan las secuencias de interés (**Tabla 7**). El protocolo de PCR utilizado se muestra en la **Tabla 8**.

Oligonucleótido	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
BRAF-G466	TGCCTCATTACCTGGCTCAC	CCCTCACACCACTGGGTAAC
BRAF-D594	TCAGGAAAACACGACATGTGAAT	CATCTGACTGAAAGCTGTATGGAT
ERK1-G186	GGACCTGATGGAGACTGACC	CAATTCAGGTCCTCCTGGGAT
ERK2-G169	ACTGCGCTTCAGACATGAGAA	TTCTGGAGCCCTGTACCAAC
ERK2-Q105	ACACCAACCTCTCGTACATCG	GCCAGGCCAAAGTCACAGAT
NRAS-Q61	GAGTACAACTGGTGGTGGT	TTCGTGGGCTTGTGTTTGTAT
NRAS-G12	CATTTTTCCTGGCTGTGGTC	ACTCGCTTAATCTGCTCCCTG

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de cDNA previa a la secuenciación. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	1 min
Desnaturalización	95°C	30 s
Anillamiento	50°C	30 s
Extensión	72°C	45 s
Extensión final	72°C	10 min
Enfriamiento	4°C	-

Tabla 8. Programa de PCR empleado para la amplificación de cDNA previa a la secuenciación.

Finalmente, los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), y fueron secuenciados por el método de Sanger en Secugen (Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid) utilizando los oligonucleótidos indicados (**Tabla 9**).

Oligonucleótido	Secuencia
BRAF-G466-sec	GACCTCAGCGAGAAAGGAAGT
BRAF-D594-sec	GGCTCCAGCTTGTATCACCA
ERK1-G186-sec	AGTACATCCACTCCGCCAAC
ERK2-G169-sec	AGCACCAACCATCGAGCAA
ERK2-Q105-sec	CCTTTGAGCACCAGACCTACT
NRAS-Q61-sec	GACAATCCAGCTAATCCAGA
NRAS-G12-sec	TGGAGCTTGAGGTTCTTGCT

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación de cDNA por el método de Sanger. Los oligonucleótidos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Análisis del crecimiento de tumores *in vivo*

En los ensayos para determinar el crecimiento tumoral *in vivo*, se emplearon ratones inmunodeficientes NSG, mantenidos en condiciones de esterilidad, libres de patógenos, con alimento y agua *ad libitum*, y sometidos a fotoperiodo 12/12. Todas las prácticas con animales se llevaron a cabo siguiendo las directrices y protocolos del Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. En todos los experimentos, el

volumen tumoral fue determinado de acuerdo con la siguiente fórmula: $\pi \cdot (3/4) \cdot (\text{ancho del tumor}/2)^2 \cdot (\text{largo del tumor}/2)$.

En los experimentos destinados a evaluar el crecimiento tumoral de células silenciadas para Erk5, las células (3×10^6) A375-ER shControl o shErk5 fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS e inoculadas por vía subcutánea en la región dorsolateral de los animales. Los ratones se observaron diariamente para detectar el inicio del crecimiento de los tumores, y los cambios en el tamaño de los mismos se midieron cada 2-3 días. Todos los ratones fueron sacrificados a los 30 días de la inoculación, o previamente en caso de que el tumor alcanzara un volumen superior a 1 cm³.

En los ensayos de tratamiento con linsitinib, se inyectaron subcutáneamente las células (3×10^6) A375 o A375-ER resuspendidas en 200 μ l de PBS. Cuando los tumores presentaron un volumen de 50-100 mm³, se inició el tratamiento. Para ello, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos y se les administró por vía oral y diariamente linsitinib (40 mg/kg; LC Laboratories, Woburn, MA) o vehículo (25 mM de ácido tartárico; Sigma-Aldrich). El linsitinib fue preparado cada día a una concentración de 4 mg/ml en 25 mM de ácido tartárico. El volumen de los tumores se determinó tres veces por semana, y finalmente todos los ratones fueron sacrificados tras 14 días de tratamiento.

Para los experimentos de tratamiento *in vivo* con vemurafenib y trametinib, 200 μ l de PBS conteniendo las células A375 (1.5×10^6) fueron inoculados por vía subcutánea. Cuando el volumen de los tumores fue de 50-100 mm³, se inició el tratamiento con vemurafenib (25 mg/kg) y trametinib (0.5 mg/kg), o con vehículo (aceite de maíz), por vía intraperitoneal y diariamente. El vemurafenib, el trametinib y el aceite de maíz fueron obtenidos de MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, EEUU). Los tumores fueron medidos tres veces por semana, y tras 14 días de tratamiento, todos los ratones se sacrificaron y los tumores fueron extraídos para su análisis.

Para el estudio de la resistencia a vemurafenib de tumores derivados de las células A375 con sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p y silenciamiento de miR-140-3p, se inocularon subcutáneamente las células (1.5×10^6) A375 H-Scr o Triple-miR en 200 μ l de PBS. Cuando el volumen de los tumores fue de 50-100 mm³, los ratones fueron tratados con vemurafenib (25 mg/kg; Selleckchem) o con vehículo (5% DMSO, 10% 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; Santa Cruz Biotechnology), por vía intraperitoneal y diariamente durante 14 días. El volumen de los tumores fue determinado tres veces por semana y todos los ratones fueron sacrificados tras finalizar el tratamiento.

Análisis estadístico

Para calcular la significancia estadística de las diferencias observadas entre células parentales y resistentes, o entre células control y tratadas, se aplicó la prueba t de Student (dos grupos), considerando la distribución normal de la muestra. En todos los casos, el nivel mínimo de significatividad fue de $p < 0.05$. Las diferencias significativas fueron representadas como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ en caso de disminución, o bien como $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$, $\Delta\Delta p < 0.01$ y $\Delta p < 0.05$ en caso de aumento.

RESULTADOS

1. Generación y caracterización de líneas celulares de melanoma con resistencia simple al inhibidor de ERK SCH772984, y con resistencia doble a vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH772984

1.1. Generación de líneas celulares de melanoma con resistencia a SCH772984

Para la generación de células resistentes al inhibidor de Erk1/2, se emplearon las líneas celulares de melanoma humano A375 y SK-Mel 28, las cuales presentan la mutación BRAF^{V600E} y son *NRAS wild type*. En ensayos de viabilidad de 48 horas utilizando el reactivo MTT, observamos que estas células eran sensibles al tratamiento con SCH772984 (SCH) (Figura 13A, B), tal y como habíamos descrito anteriormente en las células A375 (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017). Siguiendo el procedimiento explicado en Materiales y Métodos, ambas líneas celulares se expusieron secuencialmente a concentraciones crecientes de SCH hasta la obtención de poblaciones de células que crecían en presencia de 200 nM del inhibidor. Estas células resistentes fueron designadas como A375-ER y SK-Mel 28-ER, las cuales mostraron alta viabilidad en presencia de 200 nM de SCH, presentando resistencia parcial a 1 μ M del inhibidor en ambos casos (Figura 13A, B). Asimismo, el tratamiento prolongado con SCH durante 96 horas indujo apoptosis de forma significativa en las células A375, lo cual no se observó en las células A375-ER (Figura 13C).

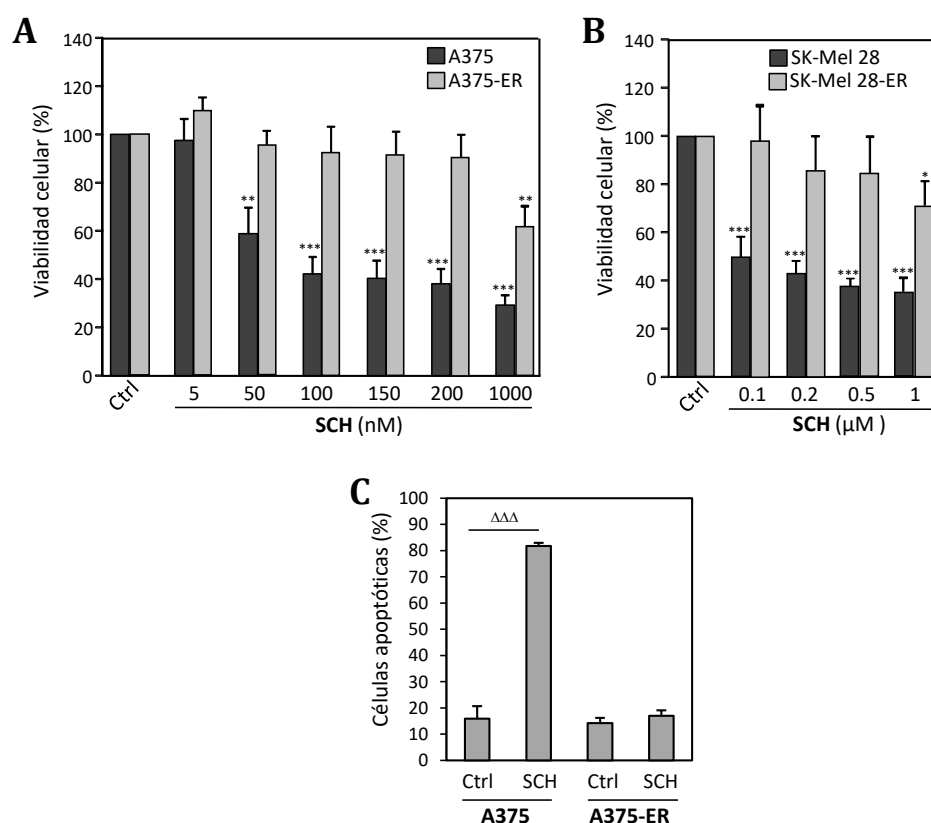


Figura 13. Caracterización de las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH. Las células A375 y A375-ER (A), o SK-Mel 28 y SK-Mel 28-ER (B), fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de SCH y su viabilidad analizada en ensayos de MTT. Se representa el porcentaje de células viables en cada condición, referido a las células no tratadas (Ctrl, 100%; n=4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). (C) El porcentaje de células apoptóticas tras 96 horas de tratamiento con 200 nM de SCH fue determinado en ensayos de citometría de flujo empleando yoduro de propidio y Anexina-V (n=3; ^{ΔΔΔ}p<0.001). Las barras de error representan la desviación estándar.

Puesto que las células resistentes eran mantenidas en cultivo en presencia de SCH, quisimos determinar si la resistencia dependía de la exposición continua al inhibidor. Para ello, las células A375-ER fueron cultivadas en ausencia de SCH durante 2 semanas, y posteriormente, se testó su sensibilidad al inhibidor tras 48 horas de tratamiento. Como muestra la **Figura 14**, las células A375-ER cultivadas sin SCH retuvieron la resistencia tras las 2 semanas, indicando que la resistencia es estable e independiente de la presencia continua del inhibidor.

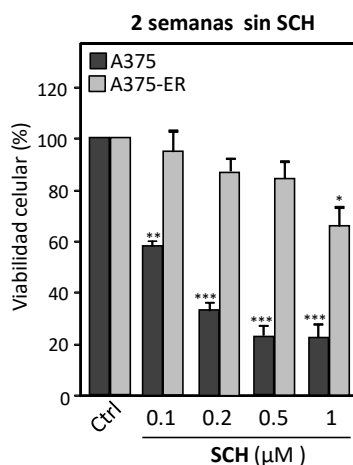


Figura 14. La resistencia a SCH de las células A375-ER es independiente de la presencia continua del inhibidor. Las células fueron cultivadas en ausencia de SCH durante 2 semanas, y tras la exposición a SCH durante 48 horas, su viabilidad fue analizada con el reactivo MTT. Se representan los datos normalizados a las células no tratadas (Ctrl, 100%; n=3; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), y la desviación estándar.

Con el objetivo de determinar si las células resistentes a SCH presentaban asimismo resistencia a otros inhibidores de ERK, testamos las células A375-ER y SK-Mel 28-ER con el compuesto Vx-11e, otro inhibidor de ERK que presenta un mecanismo de acción diferente al de SCH (ver apartado 3.3. de Introducción). De esta manera, pudimos observar que las células A375-ER y SK-Mel 28-ER mostraban resistencia a Vx-11e en comparación con las células parentales (**Figura 15A, B**). Por otra parte, las células A375 y A375-ER fueron tratadas con el inhibidor de BRAF vemurafenib (VMF) y con el inhibidor de MEK trametinib (TMT), en monoterapia o en combinación con SCH. La viabilidad de las células parentales se vio significativamente afectada en respuesta a estos tratamientos, tal y como describimos anteriormente (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017), mientras que las células A375-ER mostraron resistencia a vemurafenib, a trametinib y a las combinaciones de éstos con SCH (**Figura 15C**).

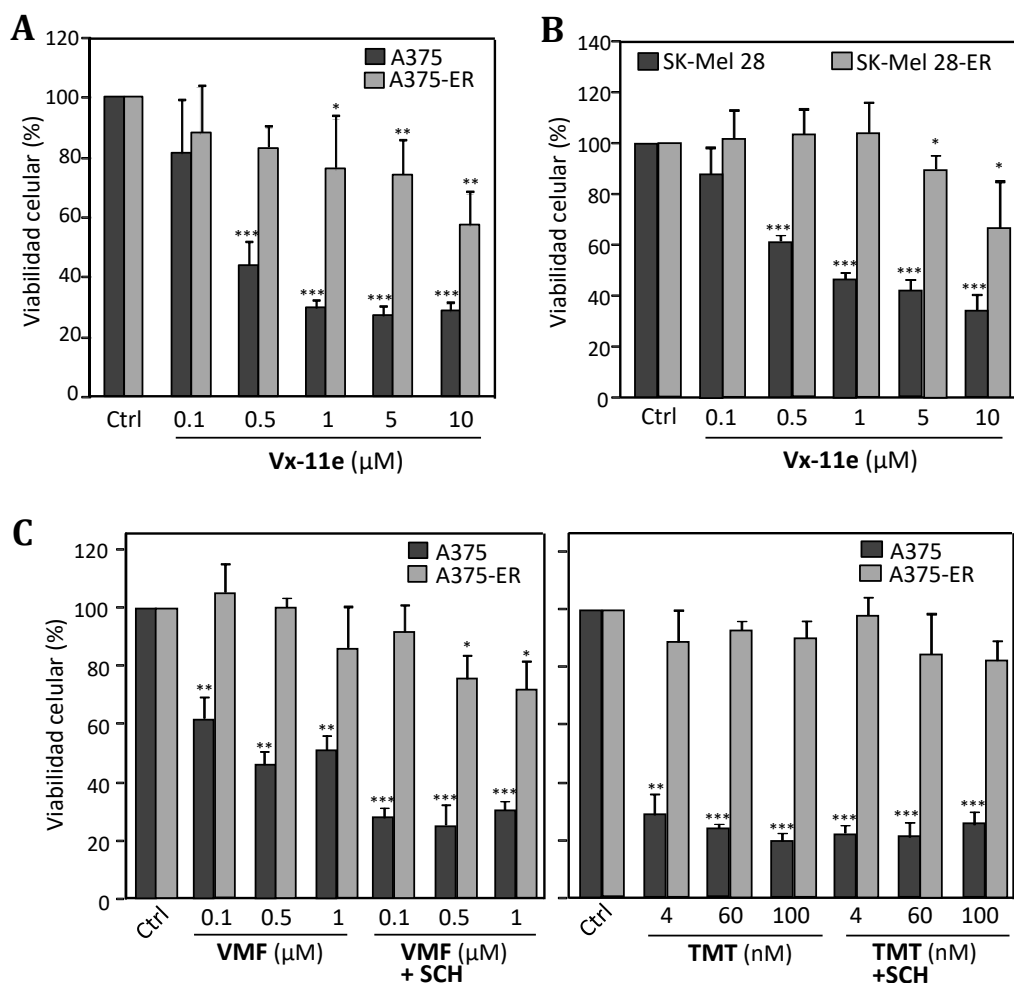


Figura 15. Resistencia de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER a otros inhibidores de la vía MAPK/ERK.

(A, B) La viabilidad celular fue analizada en ensayos de MTT tras 48 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de Vx-11e (n=3). (C) Las células fueron incubadas durante 48 horas con los inhibidores indicados y posteriormente testadas en ensayos de MTT (n=3). Se representan los valores normalizados a las células no tratadas (Ctrl, 100%; *p<0.05; **p <0.01; ***p<0.001). Las barras de error muestran la desviación estándar.

Por otra parte, generamos células SK-Mel 103 resistentes a SCH. Estas células presentan la mutación N-Ras^{Q61R} y carecen de la mutación BRAF^{V600E}. Las células SK-Mel 103 parentales mostraron sensibilidad a SCH, mientras que las células resistentes (SK-Mel 103-ER) mantuvieron viabilidad total hasta 150 nM de SCH (**Figura 16A**). Como en el caso de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER, las células SK-Mel 103-ER mostraron resistencia a Vx-11e con respecto a las células SK-Mel 103 (**Figura 16B**).

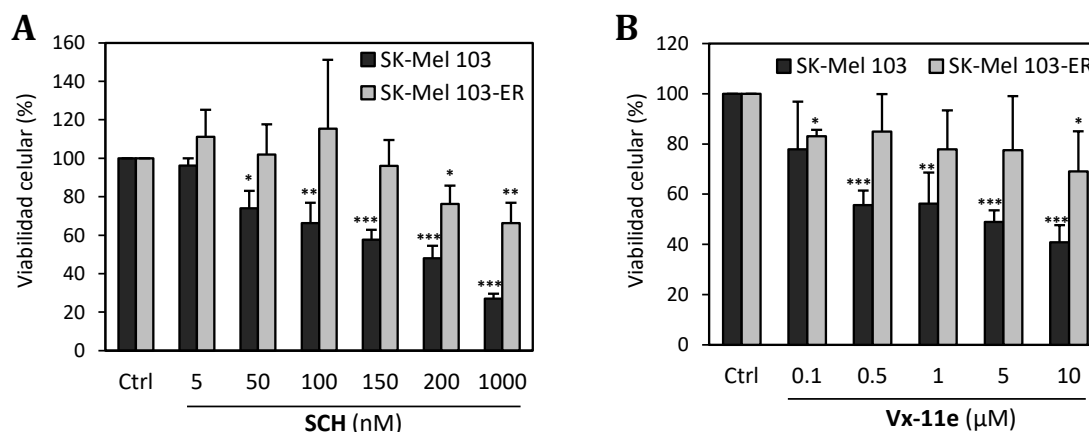


Figura 16. Caracterización de las células SK-Mel 103 resistentes a SCH. Las células fueron incubadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de SCH (A; n=4), o de Vx-11e (B; n=3), y su viabilidad analizada en ensayos de MTT. Se muestran los datos referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), y la desviación estándar.

1.2. Análisis de las características proliferativas de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER

Ensayos de proliferación durante 5 días revelaron que las células A375-ER presentan una tasa de proliferación superior a la de las células A375, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de Erk1/2 (**Figura 17A**). Por otra parte, las células resistentes a SCH presentaron mayor capacidad de crecimiento independiente de la adhesión al sustrato, evidenciado por el aumento significativo de la formación de colonias en agar (**Figura 17B**). Asimismo, el cultivo en placas de baja adhesión durante 24 y 48 horas indujo la formación de melanosferas de células A375-ER y SK-Mel 28-ER, mientras que las células A375 y SK-Mel 28 solo formaron agregados celulares irregulares (**Figura 17C**).

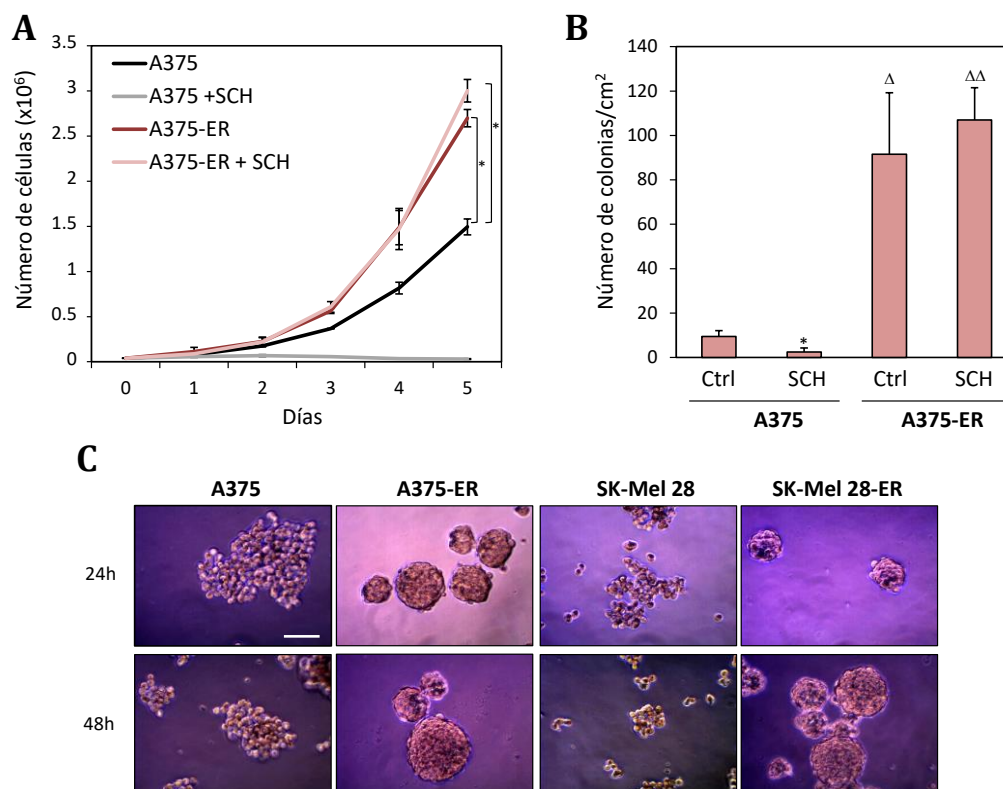


Figura 17. Características proliferativas de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER. (A) Las células fueron mantenidas en presencia o en ausencia de 200nM de SCH durante 5 días, y diariamente, el número de células fue determinado empleando el colorante vital azul tripán. Se representa la media de los experimentos y la desviación estándar ($n=2$; $*p<0.05$). (B) Las células fueron cultivadas durante 3 semanas en *soft agar* en presencia o en ausencia de 200 nM de SCH, y las colonias resultantes fueron contabilizadas ($n=3$). Se muestra la disminución ($*p<0.05$) o el incremento ($^{\Delta}p<0.05$; $^{\Delta\Delta}p<0.01$) del número de colonias con respecto a las células A375 no tratadas (Ctrl). (C) Formación de melanosferas de células A375-ER y SK-Mel 28-ER tras 24 y 48 horas de cultivo en placas de baja adhesión. Barra de escala: 100 μm .

1.3. Análisis de las propiedades adhesivas e invasivas de las células A375-ER

Durante su cultivo, observamos que las células A375-ER presentaban un retraso en la adhesión a la superficie de la placa y un menor *spreading* en comparación con las células A375 (**Figura 18A**). La quinasa FAK es un componente clave de las adhesiones focales, las cuales conectan el citoesqueleto de actina con las integrinas en la membrana celular y contribuyen a la adhesión y la migración celular (Schaller, 2010; Tapial Martínez *et al.*, 2020). Correlacionando con su menor capacidad adhesiva, las células A375-ER mostraron una fuerte disminución de la fosforilación de FAK en el residuo Tyr397 con respecto a las células parentales (**Figura 18B**). La fosforilación de FAK en dicho residuo de tirosina tiene lugar por autofosforilación tras adhesión celular (Schaller, 2010; Tapial Martínez *et al.*, 2020). Asimismo, las células A375-ER presentaron una reducción de la expresión de paxilina, una proteína adaptadora presente en estas adhesiones focales (**Figura 18B**). Mediante microscopía confocal, detectamos adhesiones focales que contenían FAK y paxilina en las células A375 adheridas a fibronectina, mientras que estas adhesiones focales no fueron observadas en las células A375-ER (**Figura 18C**).

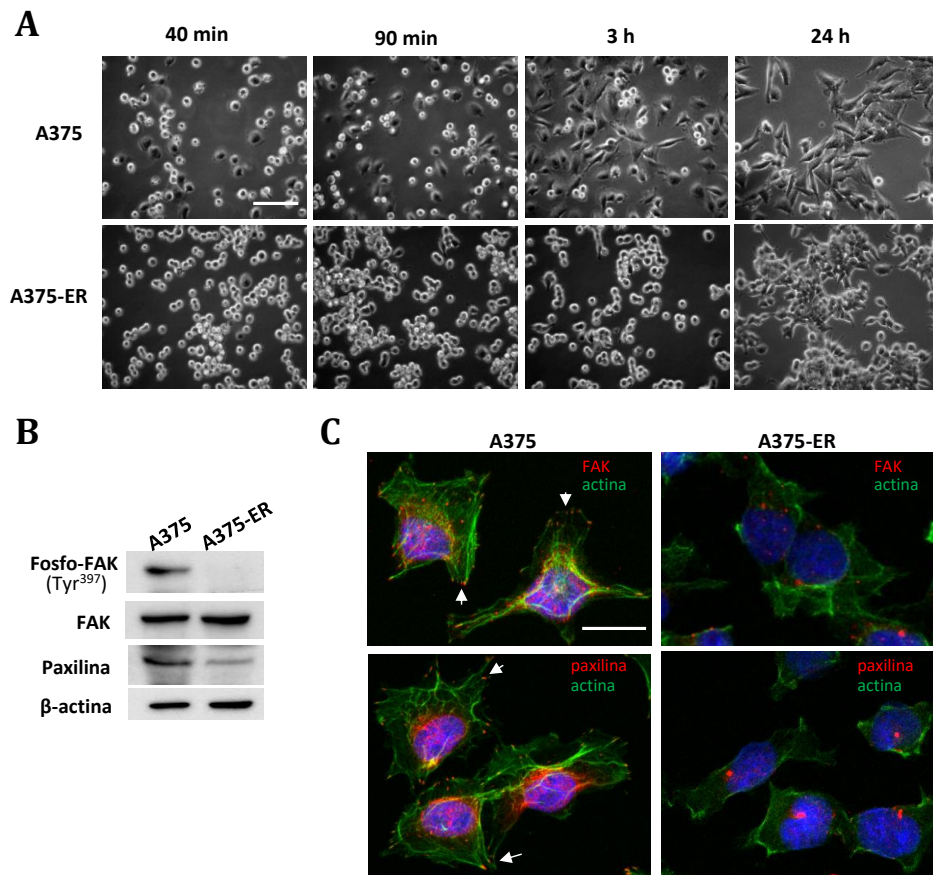


Figura 18. Características adhesivas de las células A375-ER. (A) Las células fueron tripsinizadas, cultivadas en medio DMEM completo y fotografiadas tras los tiempos indicados en un microscopio de campo claro. Barra de escala: 100 μ m. (B) Análisis de la expresión de las proteínas indicadas por *western blotting*. (C) Las células fueron cultivadas durante 16 horas sobre fibronectina (10 μ g/ml), para posteriormente analizar mediante microscopía confocal la expresión de FAK total y paxilina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y la actina con faloidina. Barra de escala: 25 μ m.

Por otra parte, observamos una fuerte inhibición de la invasión de las células A375-ER a través matrigel en comparación con las células parentales (**Figura 19**). En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de fosfo-FAK Tyr³⁹⁷ y la deficiente formación de adhesiones focales son probablemente consecuencia de la baja capacidad adhesiva de estas células, lo que se traduciría en inhibición de la invasión. Asimismo, será interesante estudiar la activación de RhoA en las células resistentes, dado que esta GTPasa es una molécula que controla la formación de fibras de estrés de actina, la dinámica de las adhesiones focales y la polarización celular, todas ellas requeridas para una eficiente invasión celular (Parsons *et al.*, 2010).

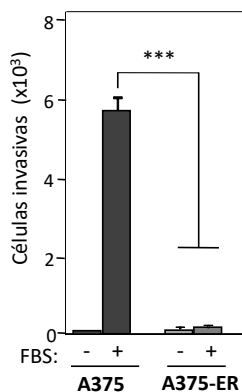


Figura 19. Bloqueo de la invasión *in vitro* de las células A375-ER. Las células A375 y A375-ER fueron analizadas en ensayos de invasión a través de matrigel hacia suero (n=3; ***p<0.001).

1.4. Generación de líneas celulares de melanoma con resistencia combinada a vemurafenib y trametinib, o a vemurafenib y SCH772984

Dada la relevancia clínica de los tratamientos combinados con inhibidores de BRAF y MEK en melanoma, obtuvimos células con doble resistencia a las combinaciones de vemurafenib y trametinib (A375-VR/TR, SK-Mel 28-VR/TR), y de vemurafenib y SCH (A375-VR/ER, SK-Mel 28-VR/ER), a partir de las líneas celulares parentales A375 y SK-Mel 28. Puesto que previamente habíamos generado células resistentes a 1.3 μM de vemurafenib (A375-VR) o a 40 nM de trametinib (A375-TR) (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017), utilizamos concentraciones similares de estos inhibidores para generar la doble resistencia. Para ello, las células A375 y SK-Mel 28 fueron expuestas directamente a 1 μM de vemurafenib y 50 nM de trametinib para la obtención de células A375-VR/TR y SK-Mel 28-VR/TR, y 1 μM de vemurafenib y 200 nM de SCH para la generación de células A375-VR/ER y SK-Mel 28-VR/ER. Tras obtener cultivos celulares creciendo normalmente en presencia de los mencionados inhibidores, los posteriores ensayos de viabilidad confirmaron que las células A375-VR/TR y SK-Mel 28-VR/TR presentaban resistencia a vemurafenib y trametinib (**Figura 20A**), mientras que las células A375-VR/ER y SK-Mel 28-VR/ER eran resistentes a vemurafenib y SCH (**Figura 20B**), tanto a los tratamientos simples como a las combinaciones correspondientes.

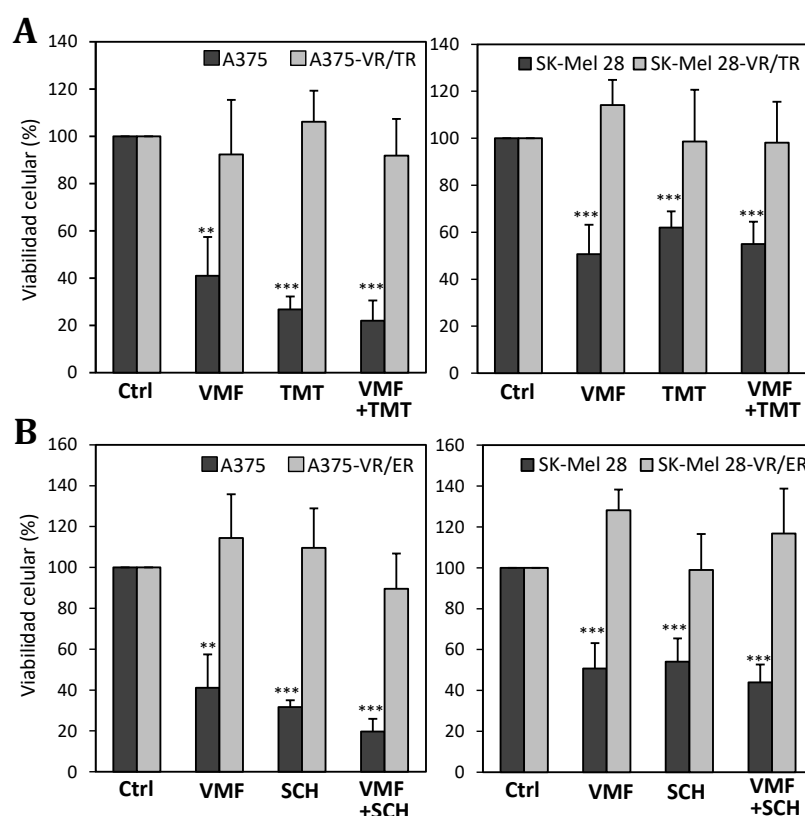


Figura 20. Caracterización de células resistentes a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK, o de BRAF y ERK. (A) Las células fueron expuestas durante 48 horas a 1 μM de VMF, o a 50 nM de TMT, o a la combinación de 1 μM de VMF y 50 nM de TMT, y su viabilidad fue determinada con el reactivo MTT (n=4). (B) Las células fueron tratadas durante 48 horas con 1 μM de VMF, o con 200 nM de SCH, o con la combinación de 1 μM de VMF y 200 nM de SCH, y posteriormente analizadas en ensayos de MTT (n=4). Se representan los valores referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; **p < 0.01; ***p < 0.001), y la desviación estándar.

Para determinar si las células A375-VR/TR eran sensibles a la inhibición de ERK, éstas fueron tratadas con SCH o con la triple combinación de vemurafenib, trametinib y SCH. Los ensayos de viabilidad mostraron resistencia de estas células al tratamiento monoterapia con SCH, así como al triple tratamiento (**Figura 21**), indicando que la inhibición de ERK no permite recuperar la sensibilidad de estas células a los inhibidores de BRAF y MEK.

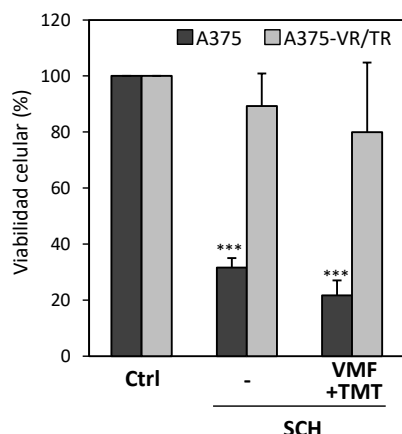


Figura 21. Resistencia de las células A375-VR/TR a SCH. Las células fueron expuestas durante 48 horas a SCH (200 nM), o a la triple combinación de SCH (200 nM), VMF (1 μ M) y TMT (50 nM), y su viabilidad testada en ensayos de MTT (n=3; ***p<0.001).

2. Identificación de alteraciones en rutas de señalización en las células resistentes, y determinación de su implicación en las resistencias

2.1. Análisis de la vía MAPK/ERK en células resistentes a SCH

A continuación, analizamos el nivel de activación de la vía MAPK/ERK en las células parentales y resistentes mediante ensayos de *western blotting*. Las células A375 y A375-ER fueron tratadas durante diferentes tiempos (**Figura 22A**) y con concentraciones distintas de SCH (**Figura 22B**), y en concordancia con el mecanismo de acción de SCH (Morris et al., 2013), el tratamiento con este inhibidor causó una disminución de la fosforilación de Erk1/2 y de su diana RSK en las células A375 (**Figura 22A, B**). De forma similar, se observó una reducción de la activación de Erk1/2 y RSK tras la exposición de las células SK-Mel 28 a SCH (**Figura 22C**). Por su parte, las células A375-ER y SK-Mel 28-ER mostraron niveles basales de fosfo-Erk1/2 y fosfo-RSK notablemente más bajos que sus correspondientes células parentales (**Figura 22A-C**), y en respuesta a SCH, la fosforilación de Erk1/2 disminuyó todavía más en estas células resistentes (**Figura 22A-C**). Estos resultados indican que SCH es capaz de inhibir la activación de Erk1/2 en estas células. Asimismo, la reducción de la activación de Erk1/2 se observó en células A375 parcialmente resistentes a 2 μ M de SCH (**Figura 22D**). Paralelamente, secuenciamos *MAPK3* (Erk1) y *MAPK1* (Erk2), no detectándose mutaciones previamente relacionadas con resistencia a la inhibición de ERK (Chaikuad et al., 2014; Jha et al., 2016). En concreto, no se observaron alteraciones en los residuos G186 de Erk1 ni en G169 o Q105 de Erk2 en las células A375-ER y SK-Mel 28-ER. Este resultado podría ser esperable, puesto que dichas mutaciones causarían la reactivación de Erk1/2 al no permitir la unión de SCH, a diferencia de lo observado en las células A375-ER y SK-Mel 28-ER. En cuanto a la activación de MEK1/2, de modo similar al resultado obtenido con ERK, detectamos niveles

más bajos de fosfo-MEK1/2 en las células resistentes que en las parentales, a pesar de presentar mayor expresión de MEK1 (**Figura 22B, C, E**). Por otra parte, no detectamos mutaciones inactivadoras en BRAF en las posiciones G466, G469, K483, D594, G596, T599 o S602, las cuales se asocian a formas de BRAF con baja o nula actividad quinasa (Richtig *et al.*, 2017). Por tanto, las células con resistencia a SCH proliferan en condiciones de baja activación de la vía MAPK/ERK, a diferencia de las células parentales, cuya proliferación es dependiente de Erk1/2.

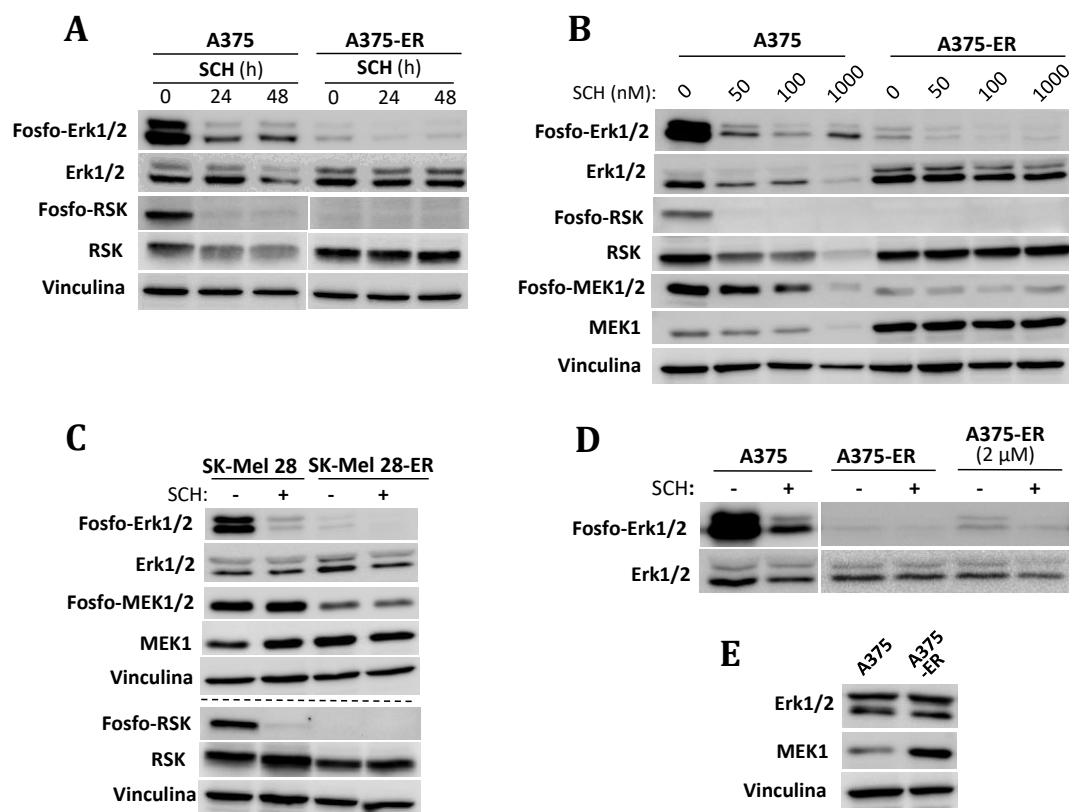


Figura 22. Análisis de la activación de la vía MAPK/ERK en células resistentes a SCH. Las células fueron incubadas en ausencia o en presencia de 200 nM de SCH (A, C, D), o de las concentraciones indicadas de SCH (B), durante 48 horas (B-D), o durante los tiempos indicados (A), y posteriormente analizadas por *western blotting*. En el caso de las células A375-ER (2 μM), la concentración de SCH empleada fue 2 μM (D). (E) Las células fueron analizadas mediante *immunoblotting*. El anticuerpo anti-vinculina se empleó como control de carga en los experimentos de *western blotting*.

A pesar de presentar menor activación de MEK1/2 y de Erk1/2, las células A375-ER y SK-Mel 28-ER mostraron mayor activación de Ras que las células parentales, y la exposición de estas últimas a SCH indujo un aumento de Ras activo (**Figura 23A**). NF1 es una proteína GAP para Ras, cuya expresión se encuentra frecuentemente disminuida en melanoma, dando lugar a un incremento de Ras-GTP (Nissan *et al.*, 2014; Krauthammer *et al.*, 2015). Curiosamente, observamos un aumento de los niveles de mRNA de *NF1* en las células A375-ER con respecto a las células parentales (**Figura 23B**), sugiriendo que la activación de Ras en estas células no parecería ser consecuencia de la pérdida de expresión de NF1. Por otra parte, la activación de Ras en las células A375 tratadas con SCH se correlacionó con una disminución de la expresión de SPRED1, tanto de los niveles de mRNA como de proteína (**Figura 23C y D**). SPRED1 pertenece a la familia de proteínas Sprouty, las cuales son inducidas por Erk1/2 y actúan como supresoras de la vía Ras-MAPK (Stowe *et al.*, 2012; Kawazoe y Taniguchi, 2019). Por tanto, existía la posibilidad de

que el aumento de Ras activo en las células A375 tras la inhibición de Erk1/2 pudiera deberse a la pérdida de la regulación *feedback* negativa dependiente de SPRED1. Las células A375-ER mostraron asimismo una disminución significativa de la expresión del mRNA de *SPRED1* con respecto a las parentales (**Figura 23C**), aunque dicha disminución no se tradujo en menor expresión de la proteína (**Figura 23D**). Adicionalmente, los niveles de SPRED1 en las células SK-Mel 28 no variaron tras el tratamiento con SCH, mientras que las células SK-Mel 28-ER mostraron mayor expresión de esta proteína que las células parentales, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor (**Figura 23D**). Colectivamente, estos resultados sugieren que el aumento de Ras-GTP observado en las células resistentes a SCH no sería consecuencia de la reducción de la expresión de SPRED1. Experimentos de secuenciación mostraron la ausencia de mutaciones en las posiciones Q61, G12 o G13 de N-Ras en las células resistentes, las cuales han sido identificadas en melanomas con resistencia adquirida a inhibidores de BRAF (Nazarian *et al.*, 2010; Shi, Hugo *et al.*, 2014).

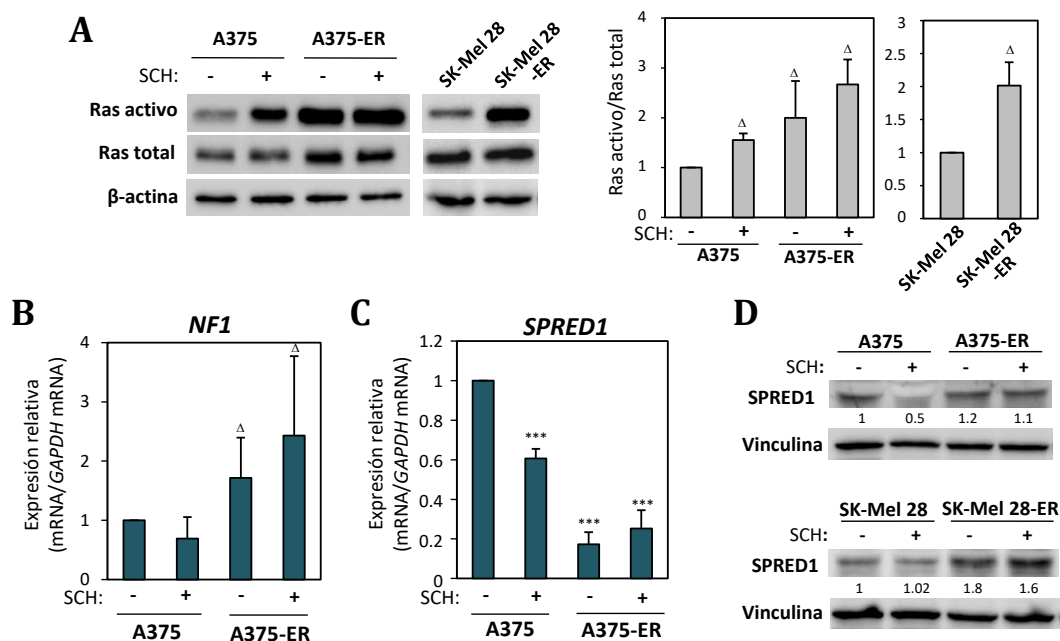


Figura 23. Análisis de la activación de Ras y de la expresión de *NF1* y *SPRED1* en células resistentes a SCH. (A, izquierda) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia o presencia de 200 nM de SCH, y posteriormente sometidas a ensayos de actividad GTPasa para detectar Ras activo. (Derecha) Se muestra la media de la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (A375 y A375-ER, n=3; SK-Mel 28 y SK-Mel 28-ER, n=4; $\Delta p < 0.05$). (B, C) Las células fueron tratadas como en (A), y la expresión de los genes indicados fue analizada por qPCR (*NF1*, n=4; *SPRED1*, n=3). La expresión aumentó ($\Delta p < 0.05$) o disminuyó ($***p < 0.001$). (D) *Western blotting* para la detección de SPRED1 tras la exposición a SCH (200 nM, 48 horas). Se indica la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=2).

2.2. Análisis de la activación de Akt en células resistentes a SCH

La activación de la vía PI3K/Akt contribuye a la supervivencia celular, y juega un importante papel en resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK en melanoma (Catalanotti *et al.*, 2013; Long, Fung *et al.*, 2014; Shi, Hugo *et al.*, 2014). Por ello, comparamos el estado de activación de Akt en las células parentales y resistentes tras el tratamiento con

diferentes concentraciones de SCH. Los resultados mostraron niveles superiores de Akt fosforilado en Ser473 en las células A375-ER y SK-Mel 28-ER que en las correspondientes células parentales, tanto en ausencia como en presencia de SCH (**Figura 24A**). El aumento en la fosforilación de Akt se correlacionó con una menor expresión de PTEN en las células A375-ER, pero no en las células SK-Mel 28-ER (**Figura 24B**). Puesto que el supresor tumoral PTEN inhibe la vía PI3K/Akt, su disminución en las células A375-ER podría representar un mecanismo que contribuyera al aumento de los niveles de fosfo-Akt.

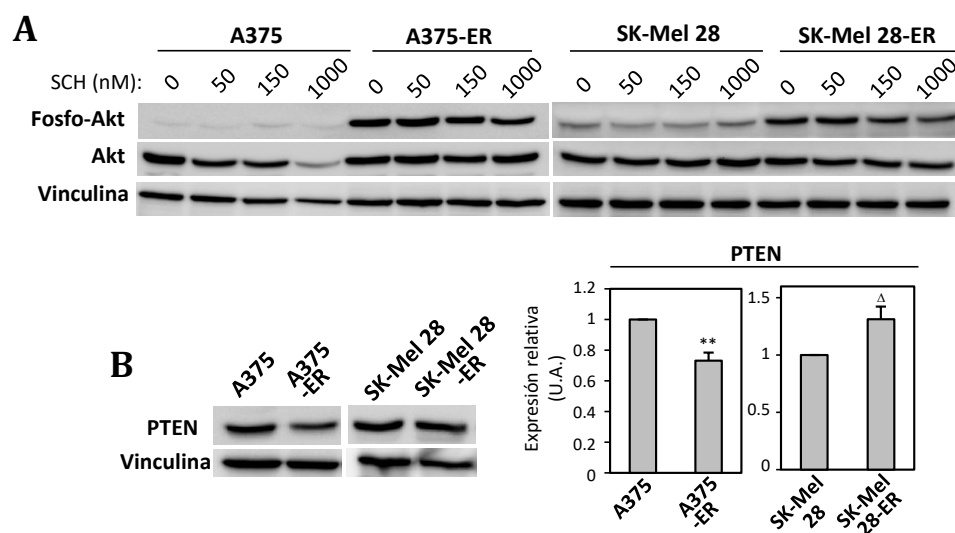


Figura 24. Análisis de la activación de la vía PI3K/Akt en células resistentes a SCH. (A) La fosforilación de Akt (Ser473) fue determinada por *immunoblotting* tras 48 horas de tratamiento con SCH. (B) Expresión de PTEN en células parentales y resistentes a SCH. Se muestra la media de la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (A375/A375-ER, n=3, **p<0.01; SK-Mel 28/SK-Mel 28-ER, n=2, ^Δp<0.05).

Para determinar la posible implicación de Akt en la resistencia a SCH, empleamos el inhibidor de Akt triciribina (TCB). El tratamiento con 1 μ M de TCB causó una reducción de cerca del 80% del nivel de fosfo-Akt en las células A375-ER (**Figura 25A**). Ensayos de MTT revelaron que la viabilidad de dichas células apenas se vio afectada tras 48 horas de tratamiento con TCB (**Figura 25B**). La combinación de TCB con SCH dio lugar a una disminución moderada de la viabilidad de las células A375-ER con respecto al tratamiento monoterapia con SCH, principalmente cuando la concentración de SCH fue elevada (500 nM; **Figura 25C**). No obstante, las células mantuvieron gran parte de su resistencia, indicando que la activación de la vía PI3K/Akt no jugaría un papel predominante en la resistencia a SCH.

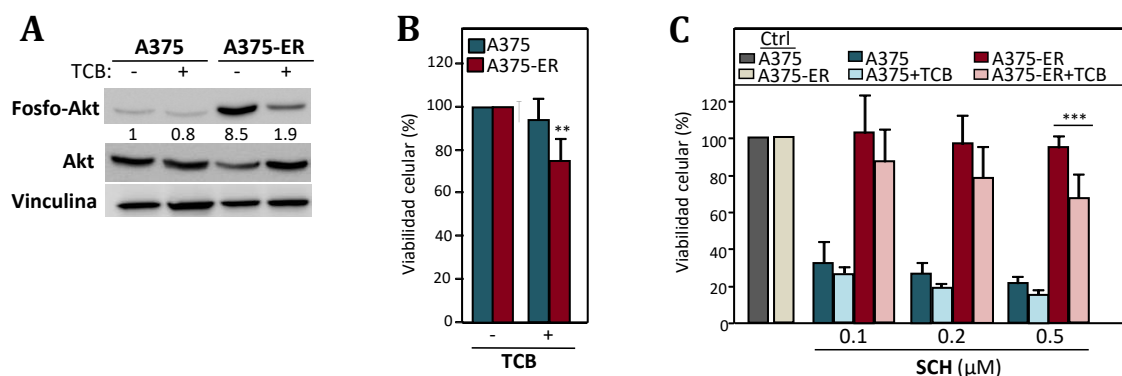


Figura 25. Efecto de la inhibición de Akt en la resistencia a SCH de las células A375-ER. (A) Las células fueron expuestas a 1 μ M de TCB (48 horas), y el nivel de fosforilación de Akt fue determinado por *immunoblotting*. Los valores indican la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=3). (B) Viabilidad celular tras la incubación con 1 μ M de TCB (48 horas; n=4). (C) Las células fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de SCH, en ausencia o presencia de TCB (1 μ M), y sometidas posteriormente a ensayos de MTT (n=5). Se muestran los valores referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; **p<0.01; ***p<0.001).

2.3. Análisis de la expresión de proteínas de ciclo celular en células A375-ER y determinación de su posible implicación en resistencia

La alteración de la expresión de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular ha sido relacionada con resistencia a inhibidores de BRAF y MEK (Smalley *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2012; Nathanson *et al.*, 2013), por lo que estudiamos si en células con resistencia a SCH existían variaciones en la expresión de dichas proteínas. En primer lugar, analizamos mediante citometría de flujo el perfil del ciclo celular (**Figura 26A**) de las células A375 y A375-ER. En ausencia de SCH, no se observaron diferencias remarcables en el perfil del ciclo celular entre células parentales y resistentes (**Figura 26B**). No obstante, el tratamiento de las células A375 con dicho inhibidor causó la parada del ciclo en fase G₀/G₁, ya que el porcentaje de células en esta fase se incrementó mientras que disminuyó la proporción de células en la fase G₂/M (**Figura 26B**). Por el contrario, la exposición a SCH de las células A375-ER no causó cambios significativos en el porcentaje celular en las fases G₀/G₁ y G₂/M (**Figura 26B**), lo cual se correlaciona con su capacidad proliferativa en presencia de este inhibidor.

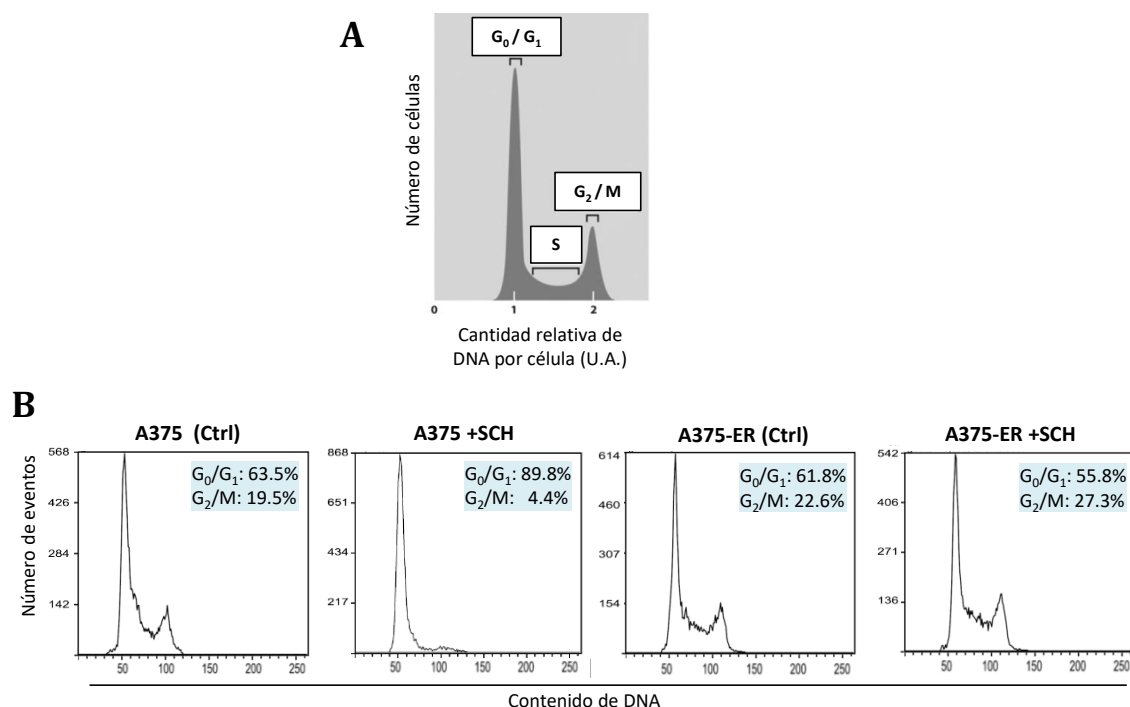


Figura 26. Análisis del ciclo celular de las células A375 y A375-ER. (A) Esquema general del perfil de ciclo celular obtenido por citometría de flujo, mediante la tinción del DNA con yoduro de propidio. Se indican las fases del ciclo, en función de la cantidad relativa de DNA. (B) Las células A375 y A375-ER fueron incubadas en ausencia o en presencia de SCH (200 nM; 48 horas), obteniéndose posteriormente los perfiles de ciclo celular. Se muestra un experimento representativo (n=3), indicando los porcentajes de células en fases G_0/G_1 y G_2/M .

A continuación, determinamos mediante *western blotting* la expresión de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) implicadas en la regulación de la transición de la fase G_1 a S. Los análisis revelaron que las células A375-ER presentaban un incremento significativo de la expresión de las proteínas Cdk4, Cdk6 y Cdk2 con respecto a las células A375 (**Figura 27A**). Los niveles de mRNA de *CDK4* y *CDK2* mostraron asimismo un aumento en las células resistentes, tanto basalmente como tras el tratamiento con SCH, mientras que la expresión de *CDK6* no se vio alterada (**Figura 27B**). Cdk4 y Cdk6 son activadas tras la formación de complejos con ciclinas D (Malumbres y Barbacid, 2009; Otto y Sicinski, 2017). Aunque en ausencia de tratamiento las células resistentes presentaban una pequeña disminución de la expresión de ciclina D1 con respecto a las células parentales, los niveles de esta proteína se mantuvieron constantes en las células A375-ER en presencia de SCH, a diferencia de la reducción observada en las células A375 (**Figura 27A**). La transcripción de *CCND1*, codificante para la ciclina D1, es inducida tras la activación de Erk1/2 (Meloche y Pouysségur, 2007). De acuerdo con estos datos, detectamos la disminución de *CCND1* en las células A375 tras la inhibición de ERK, pero no en las células A375-ER (**Figura 27B**). Además, las células A375-ER presentaron niveles de ciclina E1 (*CCNE1*), una ciclina activadora de Cdk2, mayores que las células parentales (**Figura 27B**). La expresión de *CCNE1* es inducida como consecuencia de la activación de Cdk4/6 (Otto y Sicinski, 2017), por lo que el aumento de sus niveles en las células A375-ER podría deberse a una mayor actividad de Cdk4/6.

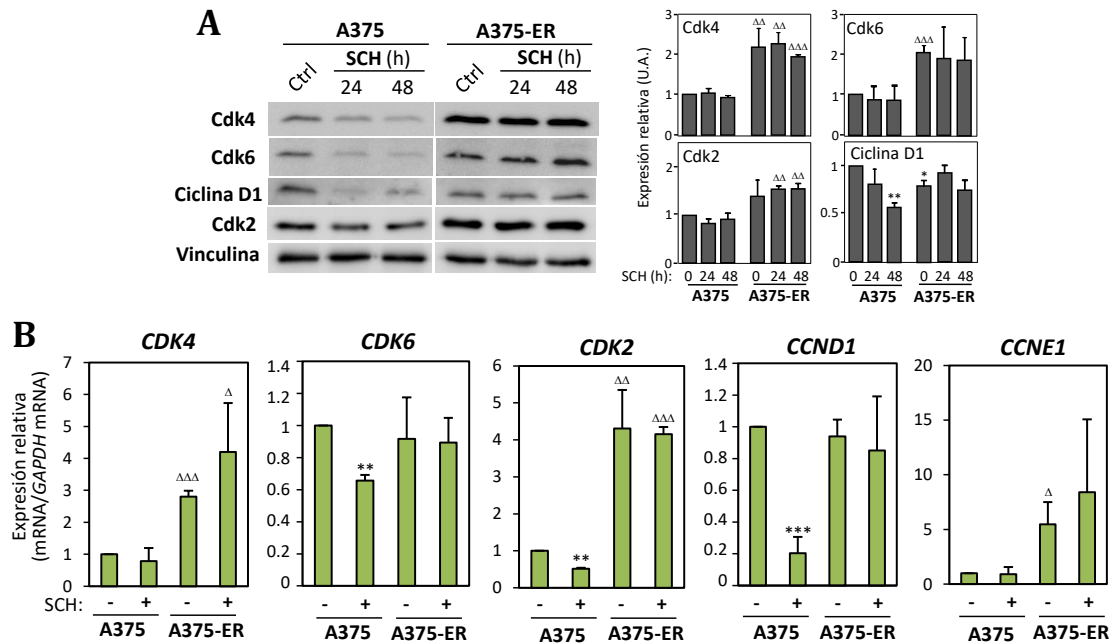


Figura 27. Análisis de la expresión de Cdks y ciclinas implicadas en la transición G₁-S en células resistentes a SCH. (A) Las células fueron incubadas con SCH (200 nM) durante los tiempos indicados, y analizadas mediante *western blotting* para la detección de Cdk4, Cdk6, Cdk2 y ciclina D1. La parte derecha de la figura muestra la media de las cuantificaciones densitométricas (n=4). (B) Las células fueron incubadas en ausencia o en presencia de SCH (200 nM; 48 horas) y los niveles de mRNA para los genes indicados fueron determinados por qPCR (n=2-4). Se muestra el incremento significativo ($\Delta p < 0.05$; $\Delta\Delta p < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$), o la disminución significativa ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

Para analizar el posible papel de Cdk4 y Cdk6 (Cdk4/6) en la resistencia a SCH, utilizamos palbociclib, un inhibidor de ambas Cdks. El tratamiento de las células A375 con palbociclib provocó la disminución de la fosforilación de RB (**Figura 28A**), una diana de Cdk4/6, lo cual es consistente con una inhibición efectiva de estas quinasas. El nivel basal de fosfo-RB fue menor en las células A375-ER que en las células A375, aunque al contrario que las células parentales, la fosforilación de RB en las células resistentes no disminuyó tras el tratamiento con palbociclib (**Figura 28A**). En concordancia con los resultados de *western blotting*, el palbociclib redujo la viabilidad de las células A375 (**Figura 28B**). Por su parte, las células A375-ER mostraron sensibilidad a la inhibición de Cdk4/6 solamente a altas concentraciones de palbociclib (5 μ M; **Figura 28B**), a pesar de no detectarse cambios en la fosforilación de RB tras el tratamiento con dicha concentración del inhibidor (**Figura 28A**). No obstante, la viabilidad de estas células resistentes en presencia de 5 μ M de palbociclib fue similar a la de las células parentales. El tratamiento con SCH disminuyó la fosforilación de RB en las células A375 pero no la de las células A375-ER (**Figura 28C**), y la combinación de SCH con palbociclib no redujo los niveles de fosfo-RB (**Figura 28C**) ni inhibió el crecimiento de las células A375-ER con respecto al tratamiento monoterapia con SCH (**Figura 28D**). En conjunto, estos resultados indican que las células A375-ER presentan resistencia a la inhibición de Cdk4 y Cdk6 con palbociclib.

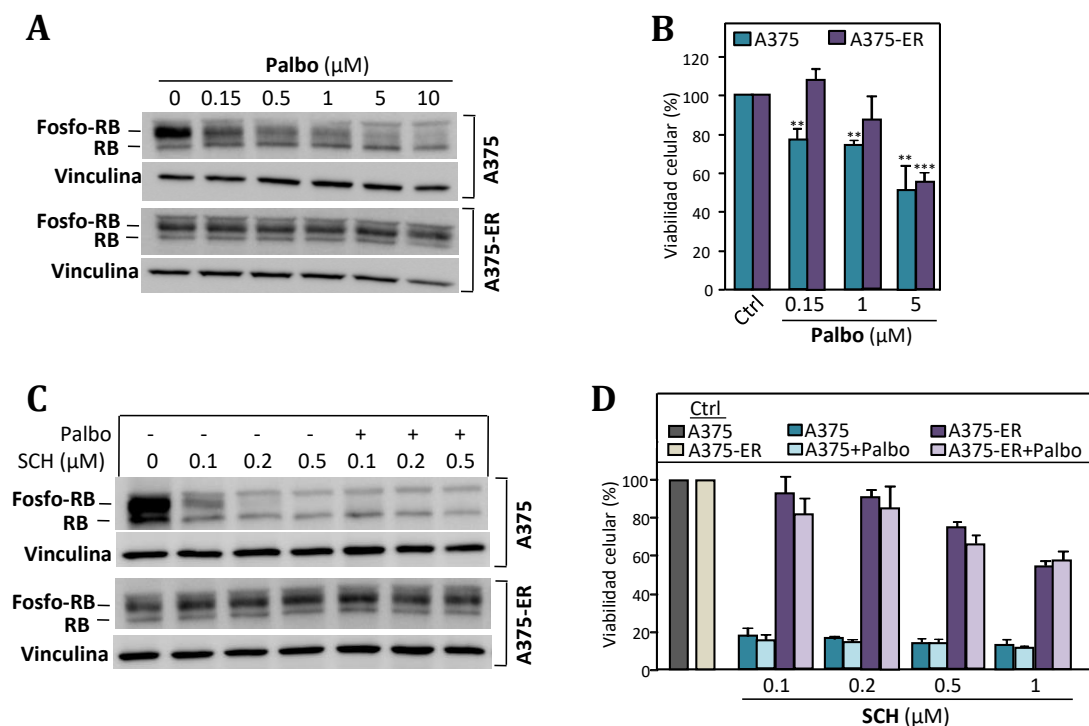


Figura 28. Las células A375-ER son resistentes al inhibidor de Cdk4/6. Las células fueron tratadas durante 72 horas con las concentraciones indicadas de palbociclib (Palbo; A, B), o con SCH solo o combinado con 1 μM de palbociclib (C, D), para posteriormente analizar los niveles de fosfo-RB (A, C), y la viabilidad celular en ensayos de MTT (B, D; n=4). Los datos de viabilidad se encuentran referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; **p<0.01; ***p<0.001).

Si bien el palbociclib fue incapaz de bloquear la actividad de Cdk4/6 en las células A375-ER, decidimos utilizar una aproximación experimental alternativa mediante el silenciamiento de la expresión de estas quinasas con RNA de interferencia. El silenciamiento de Cdk4 en las células A375-ER no alteró su viabilidad con respecto a las mismas células transfectadas con un siRNA control tras el tratamiento con SCH (**Figura 29A**). El silenciamiento de Cdk4 tampoco potenció la inhibición del crecimiento causada por SCH en las células A375 (**Figura 29A**). Puesto que las células resistentes también mostraban un incremento en los niveles de Cdk6 y Cdk2, silenciamos Cdk4 en combinación con Cdk6 o con Cdk2 (**Figura 29B**). Los resultados revelaron que ninguno de estos silenciamientos alteró la viabilidad de las células A375-ER en presencia del inhibidor de ERK, con respecto a las células control (**Figura 29B**). Globalmente, estos resultados sugieren que el aumento de expresión de Cdk4, Cdk6 y Cdk2, aunque es posible que favorezca la progresión del ciclo celular en las células A375-ER, no jugaría un papel importante en la resistencia a SCH.

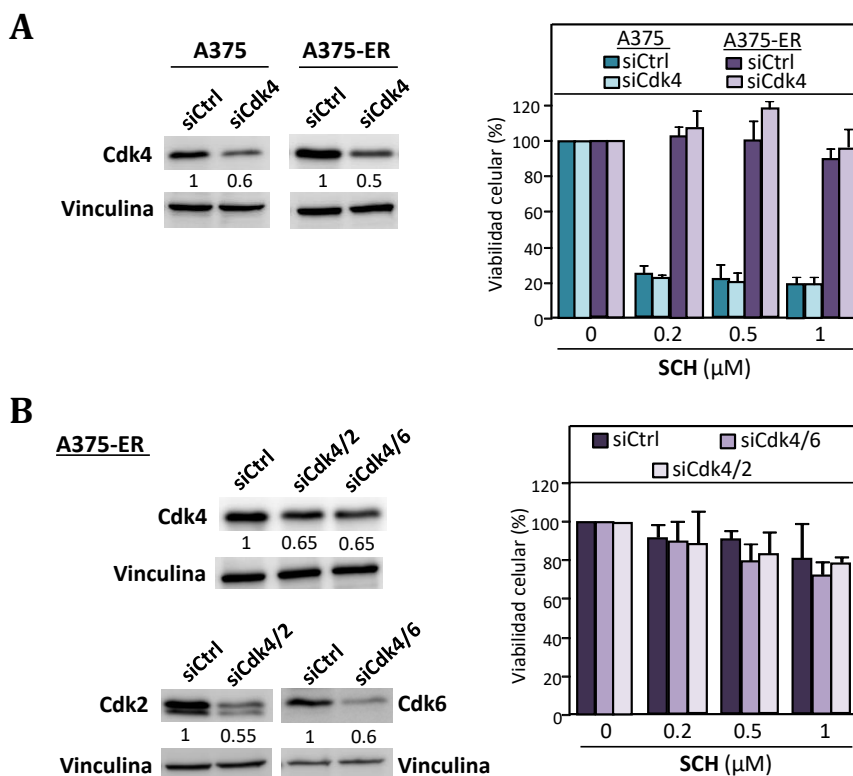


Figura 29. Silenciamiento de Cdk4, Cdk4/2 o Cdk4/6 en células resistentes a SCH y su efecto en viabilidad celular. (A, B) Las células fueron transfectadas con los siRNA indicados, y transcurridas 24 horas, fueron testadas en ensayos de MTT de 24 horas en ausencia o en presencia de SCH (n=3-4). Los valores de viabilidad están normalizados a las células sin SCH (100%). La expresión de las Cdk4 fue determinada por *western blot* a las 48 horas tras la transfección, mostrándose la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles.

2.4. Análisis de la expresión de proteínas anti-apoptóticas en células con resistencia a SCH

La inhibición de ERK con SCH induce apoptosis en células A375, pero no en las células A375-ER (ver **Figura 13C**). El análisis por *western blotting* de la expresión de proteínas anti-apoptóticas mostró un incremento de los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL en las células A375-ER relativo a las células A375, mientras que la expresión de Bcl-2 no varió de forma significativa (**Figura 30A**). La mayor expresión de Mcl-1 fue también detectada en las células SK-Mel 28-ER con respecto a sus células parentales (**Figura 30B**).

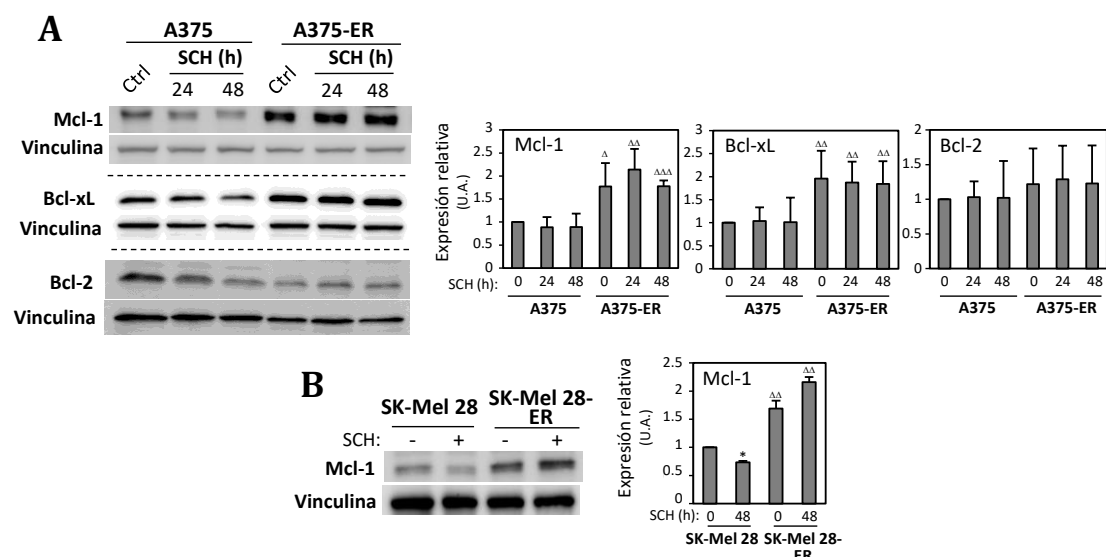


Figura 30. Estudio de la expresión de proteínas anti-apoptóticas en células resistentes a SCH. Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de SCH (200 nM) durante los tiempos indicados (A), o durante 48 horas (B), y analizadas por *immunoblotting*. Se muestran las medias de las cuantificaciones densitométricas de las bandas de los geles (A375/A375-ER: Mcl-1, Bcl-xL, n=4; Bcl-2, n=2; SK-Mel 28/SK-Mel 28-ER: Mcl-1, n=3), indicando la expresión aumentada ($\Delta p < 0.05$; $\Delta\Delta p < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$), o disminuida (* $p < 0.05$).

Dada la implicación de Mcl-1 en resistencia a vemurafenib y a la combinación de vemurafenib y trametinib (Fofaria *et al.*, 2015), realizamos estudios preliminares para determinar si esta proteína podría contribuir a la resistencia a SCH. Tras el tratamiento con un inhibidor de Mcl-1 (MIM1), observamos que se requieren altas concentraciones del mismo para disminuir moderadamente el crecimiento tanto de las células A375 como de las A375-ER (**Figura 31A**). Las células resistentes expuestas a una concentración elevada de MIM1 (15 μ M) en combinación con SCH mostraron una reducción de la viabilidad con respecto al tratamiento monoterapia con SCH (**Figura 31B**), aunque el tratamiento combinado no disminuyó de forma significativa el crecimiento de estas células con respecto a MIM1 solo. Adicionalmente, no observamos una mayor reducción de la viabilidad en las células A375-ER que en las A375 tras el tratamiento con MIM1 en ausencia o en presencia de SCH (**Figura 31A, B**). Por tanto, los resultados sugieren que, a pesar de expresar mayores niveles de Mcl-1, las células resistentes al inhibidor de ERK no presentan mayor dependencia de esta proteína anti-apoptótica para su supervivencia que las células parentales. No obstante, sería interesante testar otros inhibidores de Mcl-1 más potentes y con mayor especificidad para estudiar más a fondo el posible papel de Mcl-1 en resistencia a SCH, y averiguar asimismo si Bcl-xL podría tener alguna implicación en dicha resistencia.

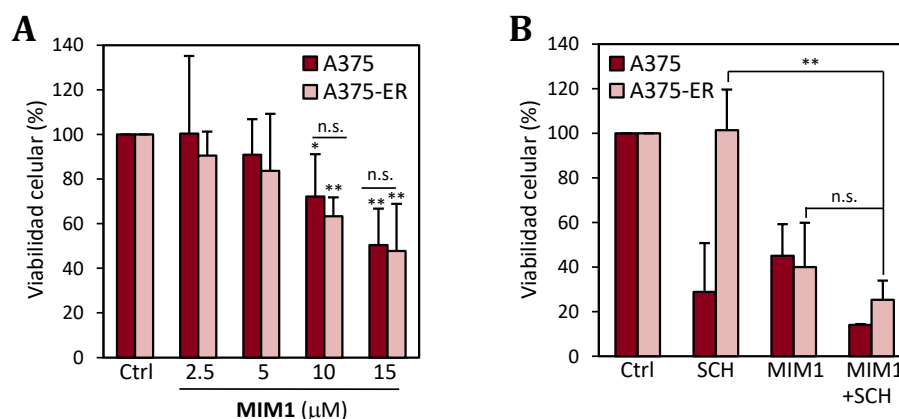


Figura 31. Efecto del tratamiento con un inhibidor de Mcl-1 en la resistencia de células A375-ER a SCH. (A) Las células fueron expuestas durante 48 horas a las concentraciones indicadas de MIM1, y analizadas en ensayos de MTT (n=3). (B) Viabilidad celular en respuesta a SCH (200 nM), MIM1 (15 μM) o a la combinación de ambos (SCH, 200 nM; MIM1, 15μM), tras 48 horas de tratamiento (n=2). Se muestran los datos referidos a las células no tratadas (Ctrl, 100%; *p<0.05; **p<0.01).

2.5. Análisis de la activación de Src quinasas en células resistentes a SCH

El incremento de la activación de proteínas de la familia de las Src quinasas (SFK) ha sido descrito en pacientes de melanoma con resistencia adquirida a vemurafenib, y la inhibición conjunta de RAF y SFK reduce el crecimiento en ratones de tumores derivados de estos pacientes resistentes (Girotti *et al.*, 2015). Las células A375-ER mostraron mayores niveles basales de fosforilación de SFK en el residuo Tyr419 que las células A375, una fosforilación que está asociada a la activación de las quinasas SFK (Boggon y Eck, 2004; Roskoski, 2015). Tras el tratamiento con SCH, el nivel de fosfo-SFK aumentó todavía más en las células resistentes, mientras que disminuyó en las células parentales (**Figura 32**).

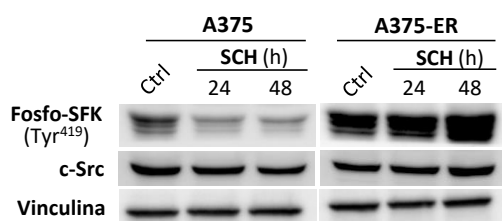


Figura 32. Análisis de la fosforilación de SFK en células A375-ER. Las células fueron expuestas a SCH (200 nM) durante 48 horas, y analizadas por immunoblotting.

El saracatinib es un inhibidor de la quinasa c-Src, el cual inhibe, además, a otros miembros de la familia SFK (Lck, Yes, Lyn, Fyn, Fgr, Blk) (Green *et al.*, 2009). El tratamiento de las células A375 y A375-ER con saracatinib bloqueó de forma efectiva la fosforilación de SFK (**Figura 33A**). No obstante, dicho tratamiento (0.5-1 μM) apenas alteró la viabilidad de las células parentales y resistentes, observándose una disminución de la misma de aproximadamente el 15-25% (**Figura 33B**). Asimismo, la combinación de saracatinib con SCH solo causó una modesta reducción de la viabilidad de las células resistentes con respecto al tratamiento monoterapia con SCH (**Figura 33C**).

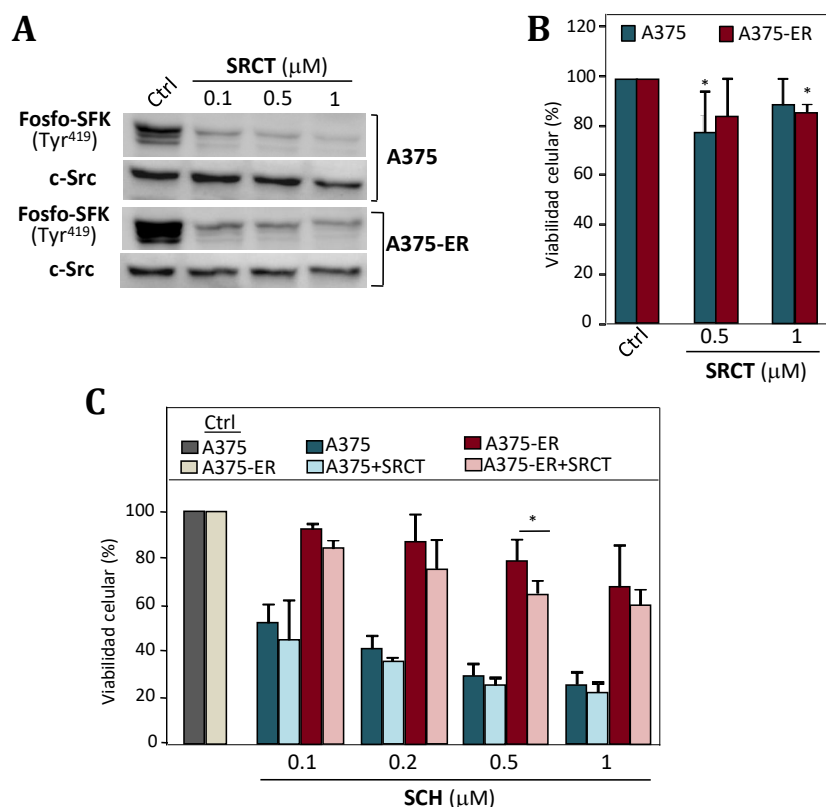


Figura 33. Efecto de la inhibición de SFK por saracatinib en la resistencia a SCH de las células A375-ER. (A) Las células fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de saracatinib (SRCT), y la fosforilación de SFK fue determinada por *western blotting*. (B, C) Las células fueron incubadas durante 48 horas con SRCT, SCH o con la combinación de SCH con 1 μ M de SRCT, y testadas en ensayos de MTT (n=4). Se representan los datos normalizados a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; *p<0.05).

Asimismo, utilizamos otro inhibidor de SFK denominado eCF506, el cual bloquea con alta potencia y selectividad a las quinasas c-Src y Yes (Fraser *et al.*, 2016). El tratamiento de las células parentales y resistentes con este compuesto disminuyó significativamente la fosforilación de SFK incluso a bajas concentraciones (10 nM; **Figura 34A**). Sin embargo, esta inhibición de SFK no se correlacionó con un efecto relevante en la viabilidad celular (**Figura 34B**). Adicionalmente, los ensayos de MTT realizados tanto con saracatinib como con eCF506 revelaron que no se producía una mayor respuesta al tratamiento en las células resistentes que en las células parentales (**Figura 33B y 34B**), sugiriendo que la activación de SFK no sería esencial en la resistencia celular a SCH.

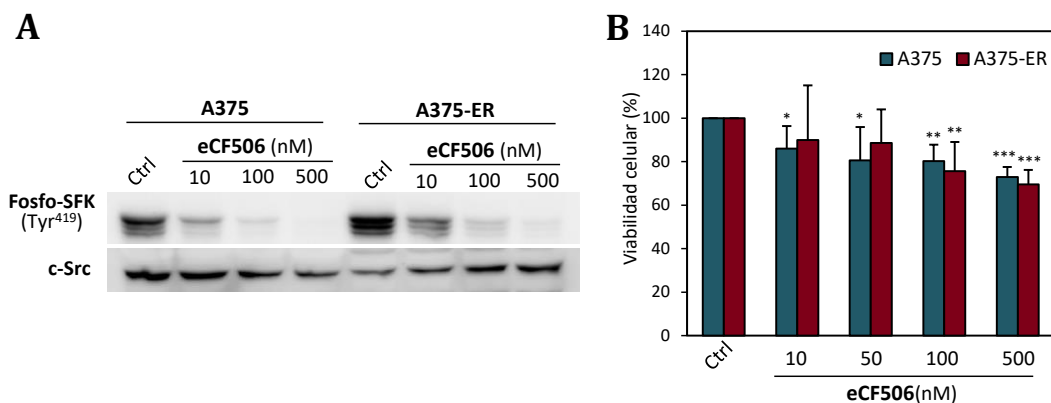


Figura 34. Efecto de la inhibición de SFK por eCF506 en la resistencia a SCH de las células A375-ER. Las células fueron incubadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de eCF506, para posteriormente analizar la fosforilación de SFK por *immunoblotting* (A), y la viabilidad mediante ensayos de MTT (B; n=4). Los datos están referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

2.6. Análisis de la expresión de MITF en células resistentes a SCH

El factor de transcripción MITF tiene un papel clave en la diferenciación del linaje melanocítico, estando implicado en la progresión del melanoma así como en resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK (Wellbrock y Arozarena, 2015; Arozarena y Wellbrock, 2019). Como se ha mencionado en la Introducción, el papel de MITF en la resistencia a inhibidores de BRAF y MEK es complejo, ya que una baja respuesta a estos tratamientos ha sido relacionada tanto con el aumento como con la pérdida de expresión del mismo. Los resultados del análisis de expresión de MITF revelaron que el tratamiento con SCH de las células A375 se traduce en un incremento transitorio del nivel de mRNA y de la proteína MITF, mientras que en las células A375-ER observamos una notable reducción de la expresión de MITF con respecto a las células parentales, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de ERK (**Figura 35A, B**). Por tanto, la pérdida de expresión de MITF en las células resistentes sugeriría un estado menos diferenciado en comparación con las células parentales.

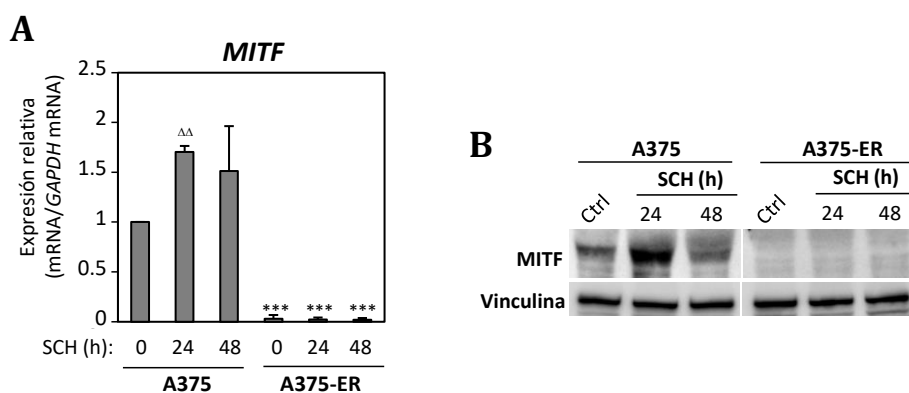


Figura 35. Análisis de la expresión de MITF en células parentales y resistentes a SCH. Las células fueron incubadas en ausencia o en presencia de SCH (200 nM), y la expresión de MITF fue determinada por qPCR (A; n=2, aumento de expresión ^{ΔΔ}p<0.01; disminución de expresión ***p<0.001), o por *western blotting* (B).

2.7. Análisis de la activación de la vía MEK5-Erk5 en células resistentes a SCH

Puesto que las células A375-ER y SK-Mel 28-ER son capaces de sobrevivir y proliferar con un bajo nivel de activación de Erk1/2, quisimos determinar si el bloqueo de fosfo-Erk1/2 en estas células estaba compensado por la activación de una MAPK alternativa. Se ha descrito recientemente la expresión de Erk5 (BMK1/MAPK7) en melanoma y su activación dependiente de BRAF oncogénico (Tusa *et al.*, 2018). Dado que MEK5 activa a Erk5 mediante la fosforilación de los residuos Thr218 y Tyr220 del motivo T-E-Y (treonina-ácido glutámico-tirosina), empleamos un anticuerpo que reconoce Erk5 fosforilado en Thr218/Tyr220 para analizar el estado de fosforilación de Erk5 dependiente de MEK5. En las células resistentes a SCH, este anticuerpo reconoció una forma de 110-115 kD y otra de menor intensidad de 140 kD, cuyos niveles no disminuyeron tras el tratamiento con SCH (**Figura 36A, B**). Por otra parte, utilizamos un anticuerpo frente al dominio C-terminal de Erk5 (anti-Erk5; Esparis-Ogando *et al.*, 2002), el cual reconoció la banda de 110-115 kD en las células parentales y en las resistentes, y en menor medida, la forma de 140 kD en las células resistentes (**Figura 36A**). El tratamiento de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER con un inhibidor de MEK5 (BIX02189; en adelante referido como BIX) disminuyó la fosforilación de Erk5 correspondiente a las bandas de 110-115 kD y de 140 kD (**Figura 36B**). Una forma con una migración electroforética de 130 kD que era insensible al tratamiento con BIX fue detectada en las células parentales con el anticuerpo anti-fosfo-Erk5 pero no con el anticuerpo anti-Erk5 (**Figura 36A, B**), sugiriendo que dicha banda se debe a un reconocimiento inespecífico del anticuerpo. Por tanto, estos resultados indican que el producto de 110-115 kD representa la forma de Erk5 fosforilada por MEK5, mientras que la banda de 140 kD posiblemente corresponda a una forma hiperfosforilada de Erk5.

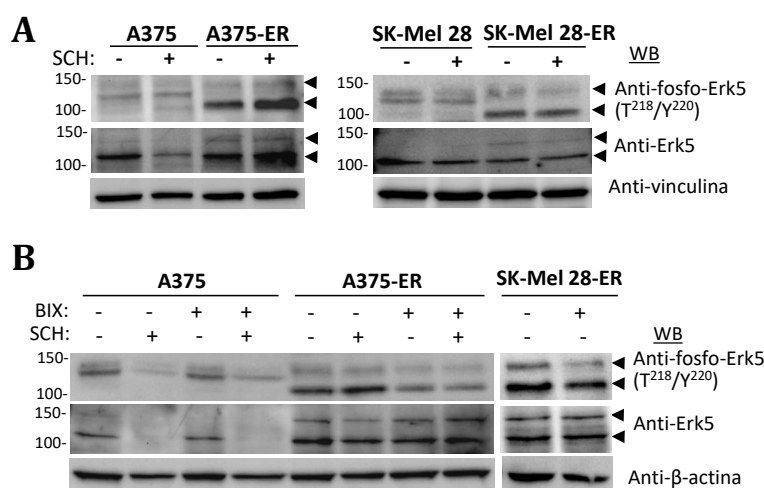


Figura 36. Aumento de la fosforilación de Erk5 dependiente de MEK5 en células resistentes a SCH. Las células fueron tratadas durante 48 horas con SCH (200 nM; A, B), BIX (5 μ M; B), o con la combinación de ambos inhibidores (SCH, 200 nM; BIX, 5 μ M; B), y la expresión y fosforilación de Erk5 fue determinada por inmunoblotting.

Para determinar si el incremento de fosforilación de Erk5 en las células resistentes se correlacionaba con un aumento de su actividad, analizamos la expresión de genes regulados por la vía MEK5-Erk5. Observamos que las células A375-ER incubadas en ausencia o presencia de SCH presentaban un incremento significativo de los niveles de c-

myc, una diana de Erk5 (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012), tanto de mRNA como de proteína (**Figura 37A, B**). Adicionalmente, el tratamiento de las células A375-ER con BIX o con la combinación de BIX y SCH se tradujo en una disminución de la expresión de *c-MYC*, indicando que el aumento en los niveles de *c-MYC* en estas células es debido, al menos en parte, a la activación de la vía MEK5-Erk5 (**Figura 37A**). Además, las células A375-ER mostraron mayor expresión de *c-JUN*, el cual constituye otro efector de Erk5 (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012), y presentaban asimismo una reducción de los niveles del inhibidor de ciclo celular *CDKN1A* (p21^{CIP1}) (**Figura 37C**). La expresión de p21^{CIP1} se encuentra inhibida de forma indirecta por Erk5 mediante la fosforilación de la proteína PML (*promyelocytic leukaemia protein*), favoreciendo así la progresión G₁-S del ciclo celular (Yang, Deng *et al.*, 2010).

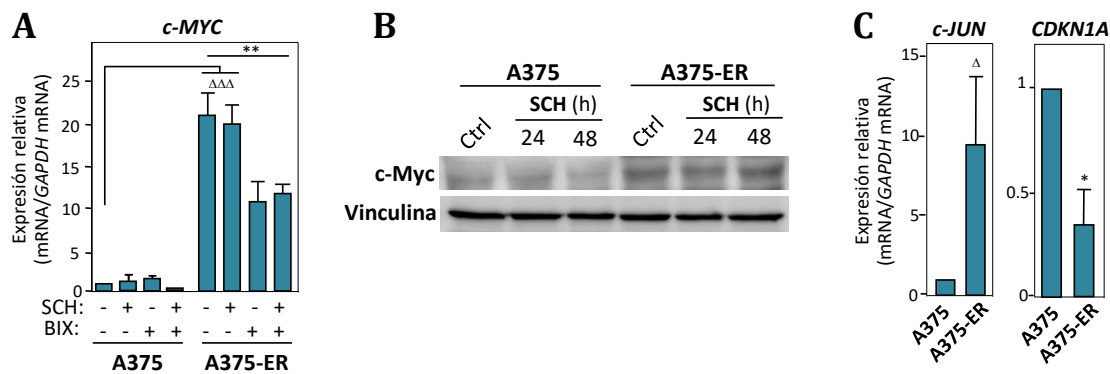


Figura 37. Expresión de genes regulados por Erk5 en las células A375 y A375-ER. (A) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia o presencia de SCH (200 nM), BIX (5 μ M), o de ambos inhibidores (SCH, 200 nM; BIX 5 μ M), para posteriormente analizar por qPCR la expresión de *c-MYC* (n=3). (B) Las células fueron expuestas a SCH (200 nM) durante los tiempos indicados y analizadas por *western blotting*. (C) Análisis mediante qPCR de la expresión del mRNA de *c-JUN* (n=3) y *CDKN1A* (n=4). Se indica el incremento (Δ p<0.05; $\Delta\Delta$ p<0.001), o la disminución (* p<0.05; ** p<0.01) de los niveles de expresión.

Dado que las células A375-ER y SK-Mel 28-ER representan poblaciones policlonales de células resistentes a SCH, aislamos clones resistentes a dicho inhibidor derivados de las células A375, para posteriormente analizar el grado de activación de Erk1/2 y Erk5 en diferentes clones. La **Figura 38** muestra que todos los clones analizados presentaban una disminución de los niveles de fosfo-Erk1/2, mientras que fosfo-Erk5 se encontraba incrementado en 22 de los 24 clones testados. Estos resultados sugieren que la inhibición de la activación de Erk1/2 asociada a un aumento de la fosforilación de Erk5 constituye una respuesta frecuente de las células A375 con resistencia a SCH, y no sería una consecuencia del crecimiento de una minoría de clones de células resistentes.

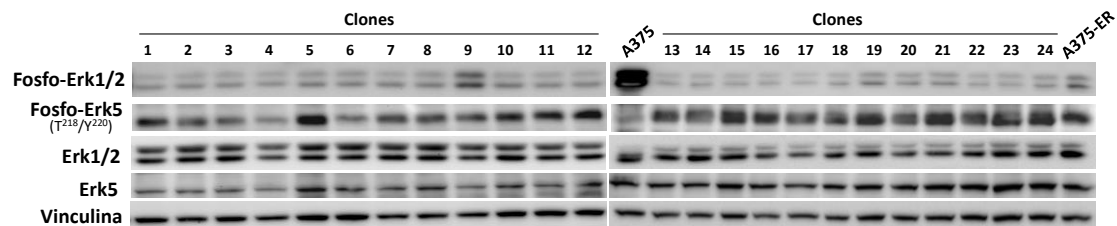


Figura 38. Análisis de la fosforilación de Erk1/2 y Erk5 en clones de células resistentes a SCH. Los clones de células A375 resistentes a SCH fueron aislados y analizados mediante *immunoblotting*.

2.8. Estudio de la implicación de Erk5 en resistencia a SCH

Para determinar si la activación de la vía MEK5-Erk5 estaba involucrada en la resistencia a SCH, tratamos las células A375-ER con BIX, lo que causó una disminución de su viabilidad con respecto a las células no tratadas (**Figura 39A**). Las células A375 también disminuyeron su crecimiento en respuesta a la inhibición de MEK5, en concordancia con los datos publicados (Tusa *et al.*, 2018). No obstante, la sensibilidad de las células resistentes fue significativamente superior a la de las células parentales (**Figura 39A**). Además, la combinación de BIX con SCH afectó notablemente a la viabilidad de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER, en comparación con el tratamiento monoterapia con SCH (**Figura 39B**). Adicionalmente, los ensayos de proliferación durante 7 días revelaron una reducción significativa del crecimiento de las células A375-ER en presencia de BIX en monoterapia o en combinación con SCH, mientras que el efecto de BIX en las células parentales fue comparativamente menor (**Figura 39C**).

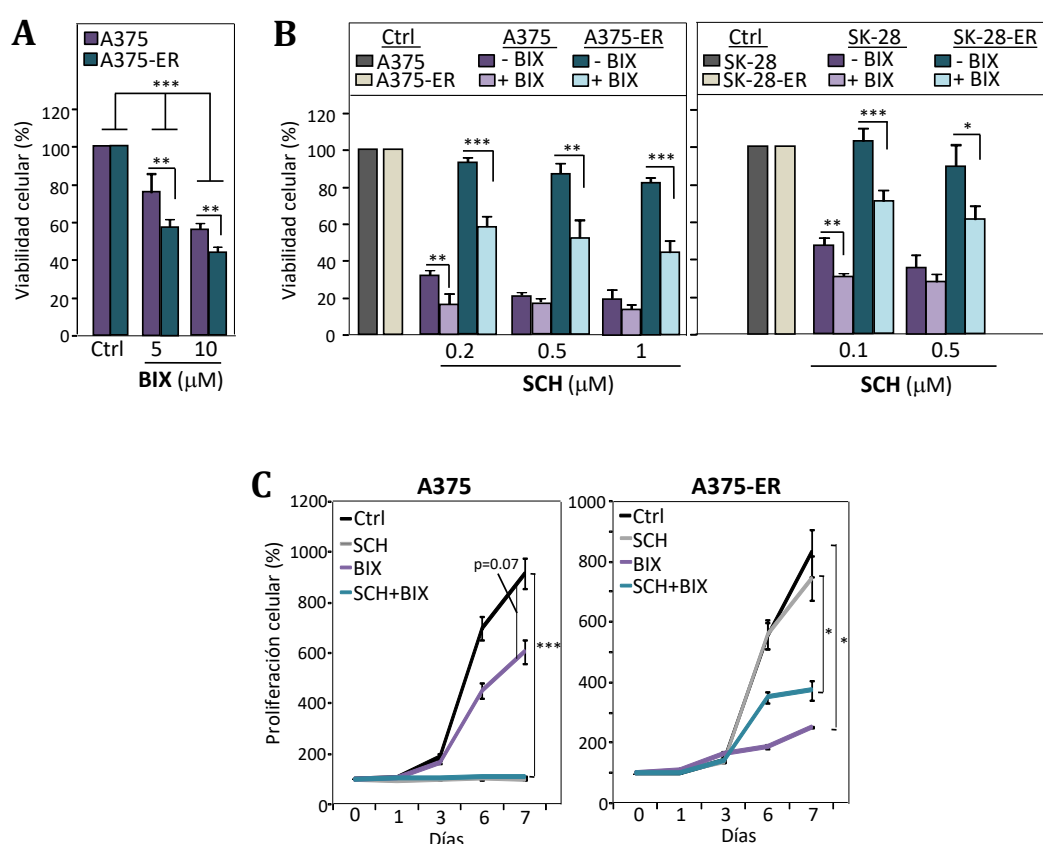


Figura 39. Efecto de la inhibición de la vía MEK5-Erk5 en la viabilidad y la proliferación de las células resistentes a SCH. (A, B) Las células fueron tratadas con BIX, SCH o con la combinación de SCH y BIX (5 μM) durante 48 horas, y la viabilidad testada en ensayos de MTT. Los valores están referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; n=4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). (C) Las células fueron incubadas en ausencia (Ctrl) o en presencia de SCH (200 nM), BIX (5 μM) o la combinación de ambos (SCH, 200 nM; BIX, 5 μM), y la proliferación de las mismas fue determinada en los días indicados mediante ensayos de CCK-8. Se muestran los datos normalizados al día de inicio del tratamiento (día 0, 100%; n=3; *p<0.05; ***p<0.001).

Por otra parte, expresamos una forma dominante negativa de MEK5 (HA-MEK5-AA) en las células A375-ER y SK-Mel 28-ER, obteniendo una disminución parcial de fosfo-Erk5 con respecto a los transfectantes control (**Figura 40A**). Notablemente, la reducción de la activación de Erk5 en los transfectantes que expresaban HA-MEK5-AA se

correlacionó con una disminución significativa de su proliferación, tanto en presencia como en ausencia de SCH (**Figura 40B**).

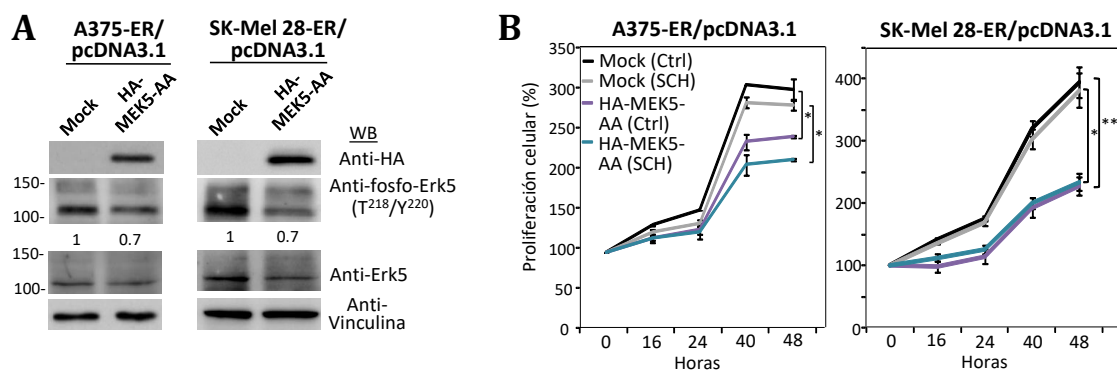


Figura 40. Efecto de la expresión de una forma dominante negativa de MEK5 en la proliferación de células resistentes a SCH. (A) Las células fueron transfectadas con un vector pcDNA3.1 control (Mock) o con el vector pcDNA3.1-HA-MEK5-AA, y posteriormente analizadas por *immunoblotting*. Los valores situados debajo de los geles muestran la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a fosfo-Erk5, referida a los valores de Erk5 total (n=3). (B) Proliferación de los transfectantes en ausencia (Ctrl) o presencia de SCH (200 nM), determinada mediante ensayos de CCK-8. Se representan los datos referidos al inicio del tratamiento (0 horas, 100%; n=3; *p<0.05; **p<0.01).

Mediante una aproximación alternativa al tratamiento con BIX o a la expresión de formas dominantes negativas de MEK5 en las células resistentes a SCH, la expresión de Erk5 fue silenciada establemente en las células A375-ER por medio de transducción lentiviral. De este modo, los transductantes que presentaban una disminución del 70% de la expresión de Erk5 (shErk5[62]) con respecto a los transductantes control (shCtrl; **Figura 41A**), mostraron una reducción significativa del crecimiento celular tras 72 horas de tratamiento con SCH (**Figura 41B**). Asimismo, en ensayos de proliferación de 7 días, los transductantes shErk5(62) mantuvieron una menor tendencia de proliferación que las células shCtrl, tanto en ausencia como en presencia de SCH (**Figura 41C**). Por el contrario, no detectamos una disminución remarcable de la proliferación de los transductantes con baja reducción de la expresión de Erk5 (shErk5[75]; **Figura 41A, B**). Notablemente, tras la inoculación por vía subcutánea de las células shErk5(62) y shCtrl en ratones inmunodeficientes (NSG), observamos una reducción significativa del crecimiento de las células silenciadas para Erk5 en comparación con las células control (**Figura 41D**). En conjunto, estos datos muestran que el incremento de activación de la vía MEK5-Erk5 en células resistentes a SCH se correlaciona con una elevada sensibilidad a la inhibición de esta vía, indicando que esta activación es requerida para la viabilidad de estas células en condiciones de inhibición de Erk1/2.

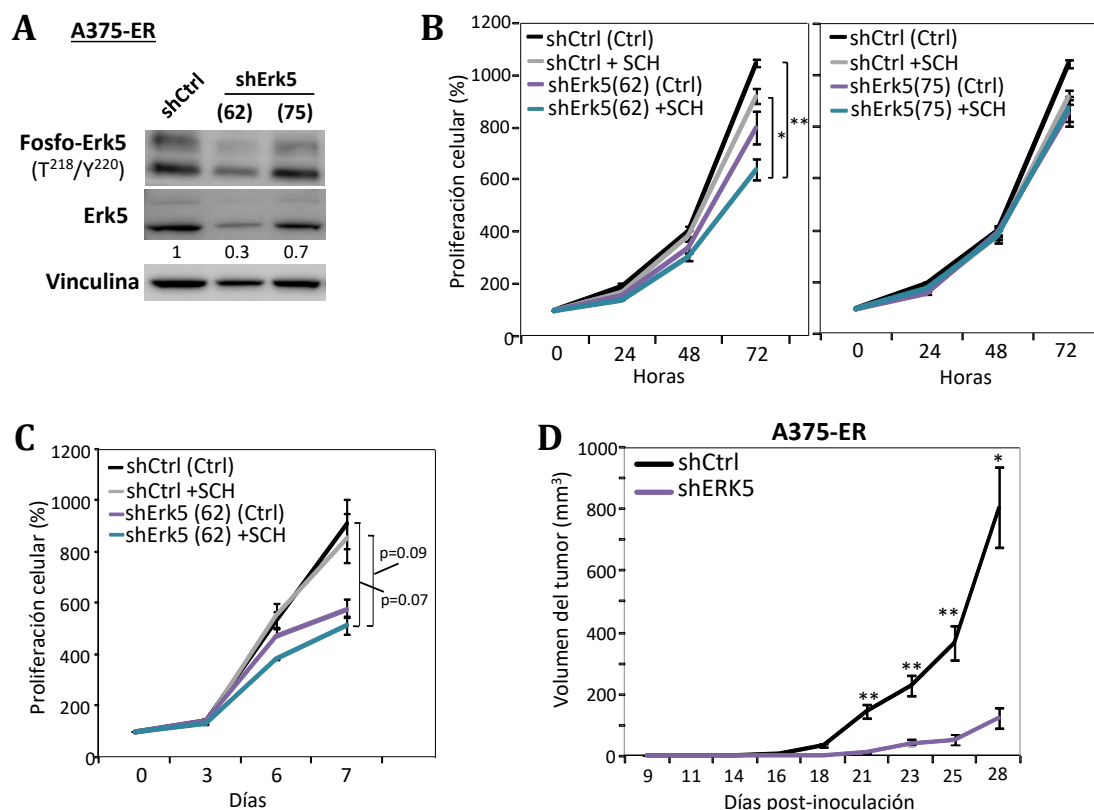


Figura 41. Efecto del silenciamiento de Erk5 en la proliferación de células resistentes a SCH. (A) Las células fueron transducidas con vectores lentivirales para inhibir la expresión de Erk5 (shErk5[62], shErk5[75]), o con el vector vacío (control, shCtrl), y el silenciamiento de Erk5 fue comprobado por *immunoblotting*. Los valores debajo de los geles muestran la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a Erk5. (B, C) La proliferación de los transductantes fue analizada mediante ensayos de CCK-8 (n=3; *p<0.05; **p<0.01). Los datos están referidos al inicio del tratamiento (100%). (D) Crecimiento *in vivo* de las células shErk5(62) y shCtrl inoculadas subcutáneamente en ratones NSG. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) (n=8; *p<0.05; **p<0.01).

2.9. Caracterización de células de melanoma con doble resistencia a VMF y TMT o a VMF y SCH. Análisis de la activación de Erk1/2, Erk5 y Akt.

A continuación, investigamos si el aumento de la activación de la vía MEK5-Erk5 observado en células resistentes a SCH podía ocurrir en células resistentes a las combinaciones de vemurafenib y trametinib, o de vemurafenib y SCH. Así, observamos que las células A375-VR/TR y A375-VR/ER presentaban una disminución de la activación de Erk1/2 asociada a un incremento de los niveles de fosforilación de Erk5, con respecto a las células A375 parentales (**Figura 42A**). Estas alteraciones en la activación de Erk5 y Erk1/2 no fueron detectadas en células con resistencia simple a vemurafenib (A375-VR; **Figura 42A**), las cuales habían sido caracterizadas previamente (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017). Las células SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-VR/ER también mostraron una reducción de fosfo-Erk1/2 acompañada de un aumento en la activación de Erk5, en comparación con las células SK-Mel 28 parentales (**Figura 42B**). Además, como en el caso de las células resistentes a SCH, las células A375 con doble resistencia presentaron mayor fosforilación de Akt que las parentales (**Figura 42C**).

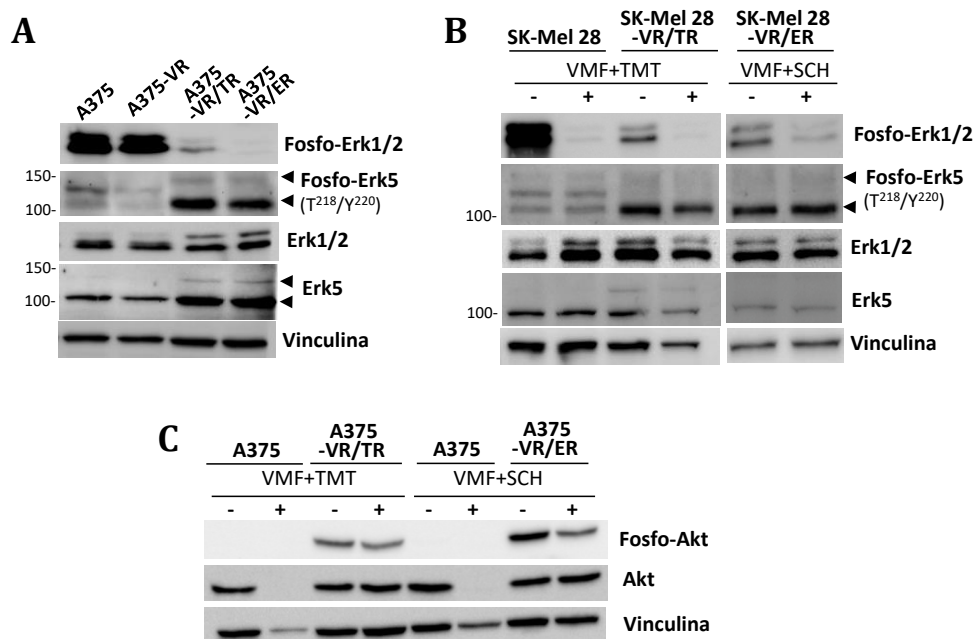


Figura 42. Análisis de la activación de Erk1/2, Erk5 y Akt en células resistentes a la combinación de inhibidores de la vía MAPK/ERK. (A) Análisis mediante *western blotting* de la expresión de las proteínas indicadas en ausencia de inhibidores. (B, C) Las células fueron tratadas durante 48 horas con VMF (1 μ M) y TMT (50 nM), o con VMF (1 μ M) y SCH (200 nM), y analizadas por *immunoblotting*.

Adicionalmente, los ensayos de proliferación en presencia de BIX mostraron que las células A375-VR/TR y A375-VR/ER eran sensibles a la inhibición de MEK5 (**Figura 43**). La disminución de la proliferación de estas células fue ligeramente superior en respuesta a los triples tratamientos (BIX con vemurafenib y trametinib, o BIX con vemurafenib y SCH) que al tratamiento con BIX solo. Por tanto, estos resultados indican que la activación de Erk5 puede compensar la inhibición de la activación de Erk1/2 causada tanto por inhibidores de Erk1/2 como por combinaciones de varios inhibidores de la vía MAPK/ERK, dando lugar así a resistencia al tratamiento.

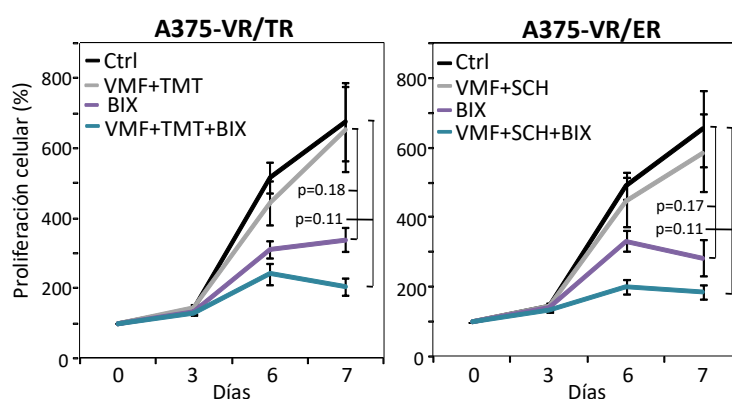


Figura 43. Análisis de la proliferación de las células resistentes a vemurafenib/trametinib o a vemurafenib/SCH en presencia del inhibidor de MEK5. Las células fueron incubadas en ausencia (Ctrl) o en presencia de los inhibidores indicados (VMF, 1 μ M; TMT, 50 nM; SCH, 200 nM; BIX, 5 μ M), y su proliferación determinada mediante ensayos de CCK-8 en los días indicados (n=3). Se muestran los datos de proliferación normalizados al día de inicio de tratamiento (día 0, 100%).

2.10. Análisis de la expresión de proteínas *scaffold* de la vía MAPK/ERK

Las proteínas *scaffold* como KSR1/2 e IQGAP interactúan con diferentes componentes de la vía MAPK/ERK, regulando la magnitud y duración de la señalización de Erk1/2, así como su localización subcelular (Casar y Crespo, 2016). Por tanto, alteraciones en la expresión de estas proteínas pueden afectar a la activación de Erk1/2. Así, se ha mostrado que la pérdida de expresión de KSR1 o IQGAP1 impide la activación de la vía MAPK/ERK mediada por Ras oncogénico (Lozano *et al.*, 2003; Jameson *et al.*, 2013), y el bloqueo de la interacción entre IQGAP1 y Erk1/2 inhibe el crecimiento de tumores con la mutación BRAF^{V600E} (Jameson *et al.*, 2013). Para estudiar si la disminución de la activación de Erk1/2 en las células resistentes podría estar relacionada con una reducción de la expresión de estas proteínas *scaffold*, hemos llevado a cabo estudios preliminares analizando los niveles de expresión del mRNA de *KSR1*, *KSR2* e *IQGAP1* en las células A375, A375-VR/TR y A375-ER. Los resultados revelaron que no había diferencias significativas en la expresión de *IQGAP1* entre estos tres tipos celulares, mientras que los niveles de *KSR1* y *KSR2* aumentaron significativamente en las células resistentes comparado con las células parentales (Figura 44). Estos datos sugieren que es poco probable que la disminución de fosfo-Erk1/2 en las células A375-ER y A375-VR/TR implique a KSR1/2 o IQGAP1, aunque sería interesante determinar sus niveles proteicos y sus interacciones con BRAF, MEK1/2 y/o Erk1/2.

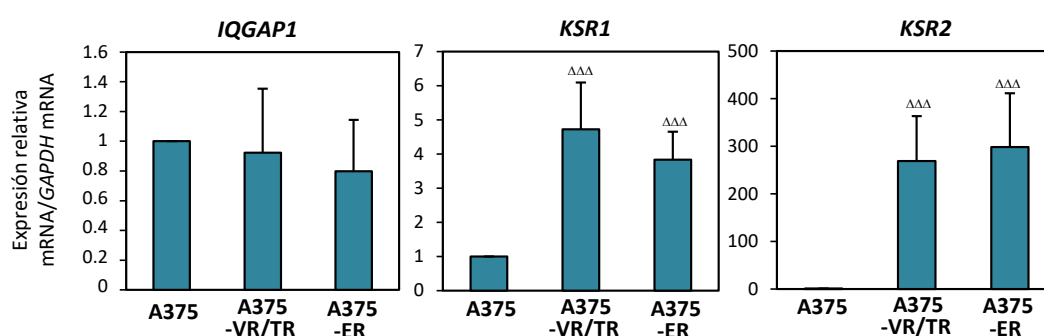


Figura 44. Análisis de la expresión de *IQGAP1*, *KSR1* y *KSR2* en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia de inhibidores de la vía MAPK/ERK y analizadas mediante qPCR (n=5-6; ΔΔΔp<0.001).

2.11. Estudio de la expresión y función de fosfatasa de la familia DUSP en las células resistentes

Como ya se ha mostrado, las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH, vemurafenib/trametinib o vemurafenib/SCH presentan una importante disminución de fosfo-Erk1/2, asociado a un incremento de la activación de MEK5-Erk5 (ver Figuras 22, 36 y 42). Las fosfatasa de la familia DUSP regulan negativamente las quinasas JNK, p38 y Erk1/2 mediante la desfosforilación de residuos de treonina o tirosina en el motivo conservado T-X-Y de sus segmentos de activación (Kidger y Keyse, 2016). Como se ha mencionado previamente en la Introducción, DUSP5 y DUSP6 muestran una elevada afinidad por Erk1/2, y su expresión es inducida tras la activación de Erk1/2 como mecanismo de regulación *feedback* negativo. Adicionalmente, varios estudios han

propuesto que Erk5 pudiera ser también un sustrato de DUSP6 (Kamakura *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2006; Sarközi *et al.*, 2007). Analizamos en primer lugar los niveles de expresión de DUSP5 y DUSP6 en las células parentales y resistentes. La expresión del mRNA de *DUSP6* en las células A375-VR/TR, A375-ER, SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-ER fue casi indetectable en comparación con las células parentales (**Figura 45A**), observándose asimismo una fuerte disminución de la proteína DUSP6 en las células A375 resistentes (**Figura 45B**). De modo similar, la expresión de *DUSP5* fue considerablemente menor en las células A375-VR/TR y A375-ER que en las células A375 (**Figura 45C**). Por otra parte, no detectamos alteraciones significativas en la expresión de *DUSP5* en las células SK-Mel 28-VR/TR en ausencia de vemurafenib y trametinib relativo a las células SK-Mel 28, mientras que observamos una moderada reducción de dicho mRNA en las células SK-Mel 28-VR/TR en presencia de los inhibidores y en las células SK-Mel 28-ER (**Figura 45C**). Puesto que la transcripción de *DUSP5* y *DUSP6* está regulada por fosfo-Erk1/2, estos resultados sugieren que la reducción de la activación de Erk1/2 en las células A375 y SK-Mel 28 parentales expuestas a los distintos inhibidores, así como predominantemente en las células A375 resistentes, es probablemente responsable de la reducción de la expresión de *DUSP6* y *DUSP5* (**Figura 45A, C**).

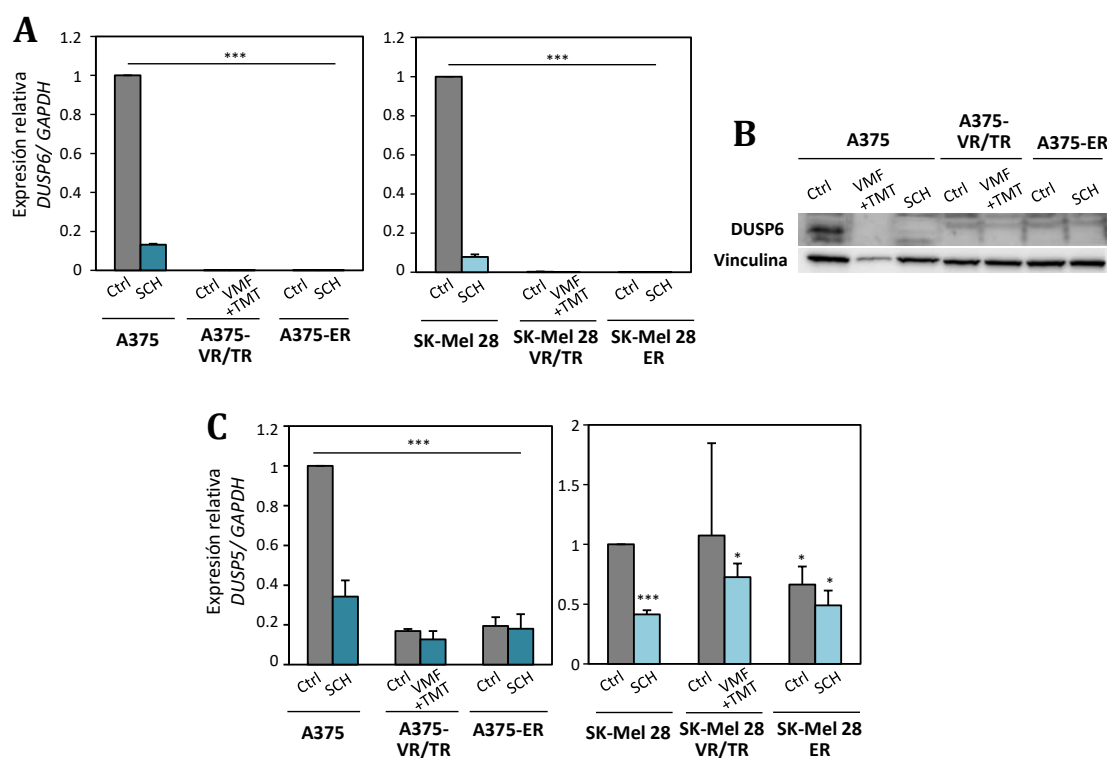


Figura 45. Expresión de *DUSP6* y *DUSP5* en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de los inhibidores indicados (SCH, 200 nM; VMF, 1 μ M; TMT, 50 nM), y posteriormente analizadas por qPCR (n=2-4; A, C) o inmunoblotting (B). Se muestra la disminución significativa (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) de la expresión de *DUSP6* o *DUSP5* con respecto a las células parentales sin tratamiento (Ctrl).

A continuación, nos preguntamos si la elevada fosforilación de Erk5 en las células A375 resistentes pudiera ser el resultado de los bajos niveles de expresión de DUSP6. Para abordar esta cuestión, sobreexpresamos esta fosfatasa en las células A375-ER y A375-VR/TR (**Figura 46A, B**), lo que se tradujo en una disminución adicional de la fosforilación

de Erk1/2 en las células resistentes, sin alterar de forma significativa los niveles de fosfo-Erk5 (**Figura 46C**). Estos datos indican que DUSP6 actúa preferentemente sobre Erk1/2 en las células A375-ER y A375-VR/TR, y sugieren que el aumento de la fosforilación de Erk5 en estas células no sería una consecuencia de la baja expresión de la fosfatasa DUSP6. Este resultado concuerda con el trabajo publicado por Arkell *et al.*, en el que demuestran que DUSP6 es incapaz de interaccionar e inactivar a Erk5, siendo su actividad fosfatasa específica de Erk1/2 (Arkell *et al.*, 2008).

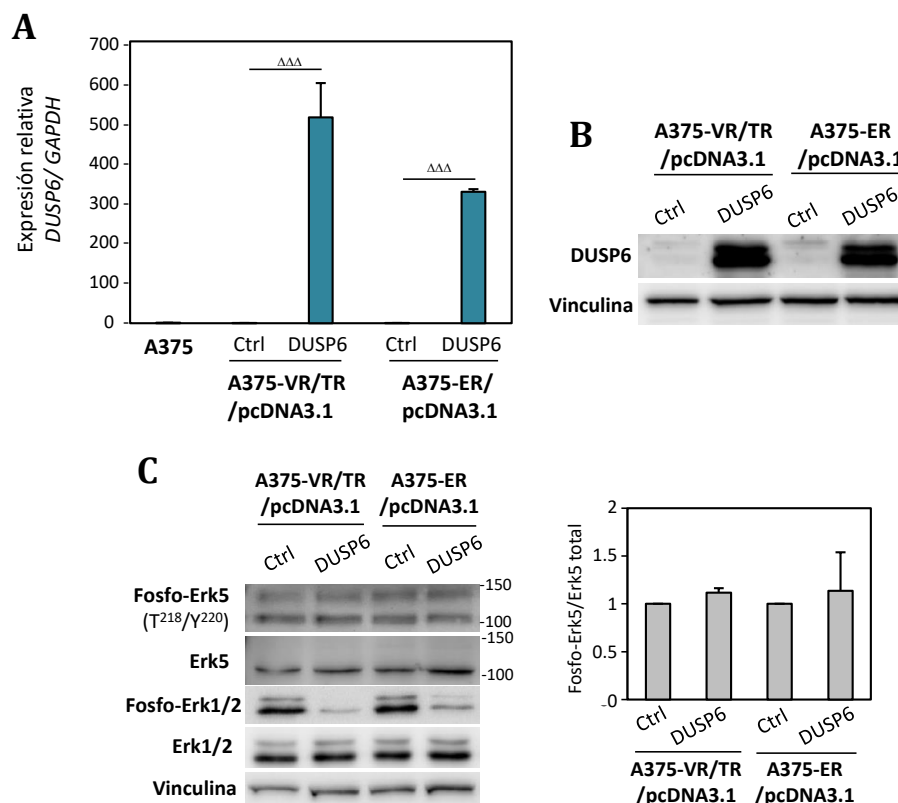


Figura 46. Análisis de la fosforilación de Erk1/2 y Erk5 en células resistentes con sobreexpresión de DUSP6. Las células A375-VR/TR y A375-ER fueron transfectadas con el vector pcDNA3.1-V5-His A-DUSP6 o con el vector pcDNA3.1 (Ctrl), y tras 48 horas, la expresión de DUSP6 fue analizada por qPCR (A) y *western blot* (B) (n=2; $\Delta\Delta p < 0.001$). Los datos en (A) se muestran normalizados a la expresión de DUSP6 en las células A375. (C, izquierda) Análisis de la fosforilación de Erk5 y Erk1/2 en los diferentes transfectantes. (Derecha) Se indica la media de la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a fosfo-Erk5, referida a los valores de Erk5 total (n=2).

2.12. Estudio del papel de PAK1 y PAK2 en la activación de Erk5 en células resistentes

Las quinasas PAK (*p21-activated kinase*) han sido implicadas en resistencia a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK en células de melanoma, mediante la activación de vías de señalización alternativas a Erk1/2 (Lu *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha descrito que PAK2 es capaz de activar la vía MEK5-Erk5 en células endoteliales (Radu *et al.*, 2015), lo que nos llevó a estudiar la posible implicación de proteínas PAK en la activación de Erk5 en las células resistentes a vemurafenib/trametinib o a SCH. Las quinasas PAK del grupo I (PAK1, PAK2 y PAK3) pueden ser activadas por las GTPasas Rac

y Cdc42, mientras que las de grupo II (PAK4, PAK5, PAK6) son activadas exclusivamente por Cdc42 (Radu *et al.*, 2014). En primer lugar, analizamos los niveles de activación de Rac1 y Cdc42 en las células parentales y resistentes. Los ensayos de actividad GTPasa revelaron un incremento de activación de Rac1 en las células A375-VR/TR, A375-ER y, en menor medida, en las células SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-ER, en comparación con las células parentales correspondientes (**Figura 47A**). Por contra, no observamos alteraciones significativas en los niveles de Cdc42 activo en las células resistentes relativo a las parentales (**Figura 47B**).

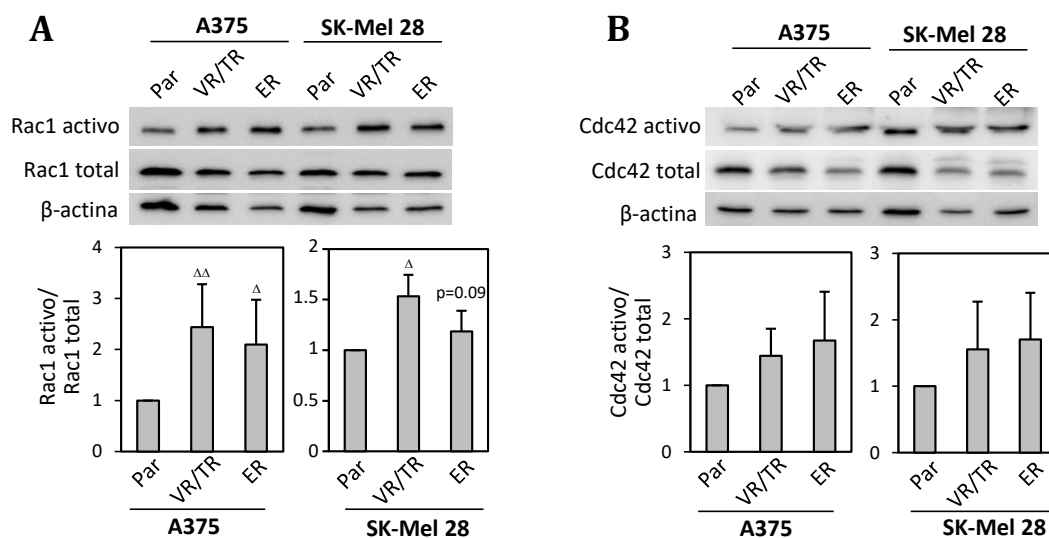


Figura 47. Análisis de la activación de Rac1 y Cdc42 en células resistentes a SCH o a la combinación de vemurafenib y trametinib. Los niveles de Rac1 (A) y Cdc42 (B) activos en las células parentales (Par) y resistentes fueron determinados mediante ensayos de actividad GTPasa. En los paneles inferiores se muestra la media y desviación estándar de la cuantificación densitométrica de los geles (n=3-4; ^Δp<0.05; ^{ΔΔ}p<0.01).

Debido al incremento en la activación de Rac1 en las células resistentes, estudiamos la expresión de las quinasas PAK de grupo I. El análisis de los niveles de mRNA mostró que las células A375-VR/TR y A375-ER tenían mayor expresión de *PAK1* y *PAK2* que las células parentales, mientras que las células SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-ER no presentaban variaciones en la expresión de estas quinasas en comparación con sus células parentales (**Figura 48A, B**). Por otro lado, la expresión de *PAK3* no fue detectada (no mostrado).

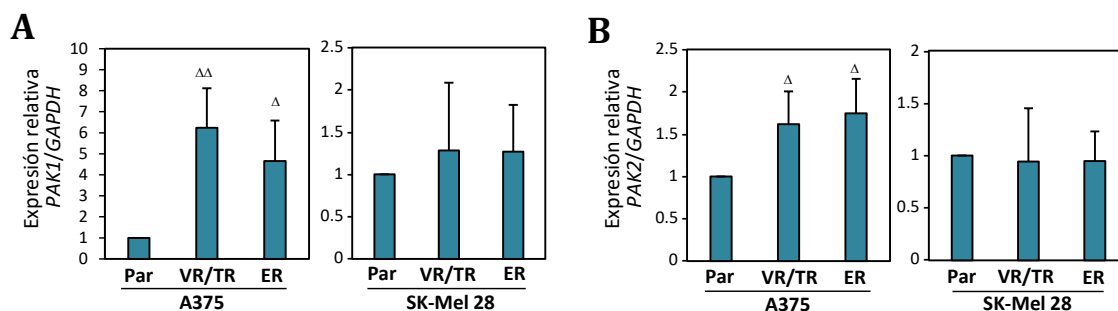


Figura 48. Análisis de la expresión de PAK1 y PAK2 en células resistentes. La expresión de *PAK1* (A) y *PAK2* (B) fue determinada por qPCR en células parentales (Par) y resistentes (n= 3-4; ^Δp<0.05; ^{ΔΔ}p<0.01).

Utilizando un anticuerpo comercial anti-PAK1/2/3, detectamos una forma de aproximadamente 60 kD, la cual fue más intensa en las células resistentes que en las parentales (**Figura 49A**). Puesto que el peso molecular descrito de PAK1 y PAK3 (68 kD) es superior al de PAK2 (61 kD), consideramos que dicha banda probablemente correspondía a PAK2. A pesar de observarse la expresión de *PAK1* por qPCR en las células A375 y SK-Mel 28 parentales y resistentes, no pudimos detectar la proteína PAK1 en estas células con el anticuerpo empleado.

De acuerdo con esto, un siRNA dirigido a PAK2, pero no un siRNA para PAK1, causó la disminución de la intensidad de dicha banda de 60 kD en las células A375-VR/TR y A375-ER (**Figura 49B**). El aumento de expresión de PAK2 y la mayor activación de Rac1 se correlacionaron con un incremento de fosfo-PAK2 en las células A375 y SK-Mel 28 resistentes, en comparación con las parentales (**Figura 49A**). Sin embargo, el silenciamiento de aproximadamente el 50% de la expresión de PAK2 no alteró de forma significativa la fosforilación de Erk5 (110-115 kD) dependiente de MEK5 en las células A375-VR/TR, con respecto a los transfectantes control (**Figura 49B**).

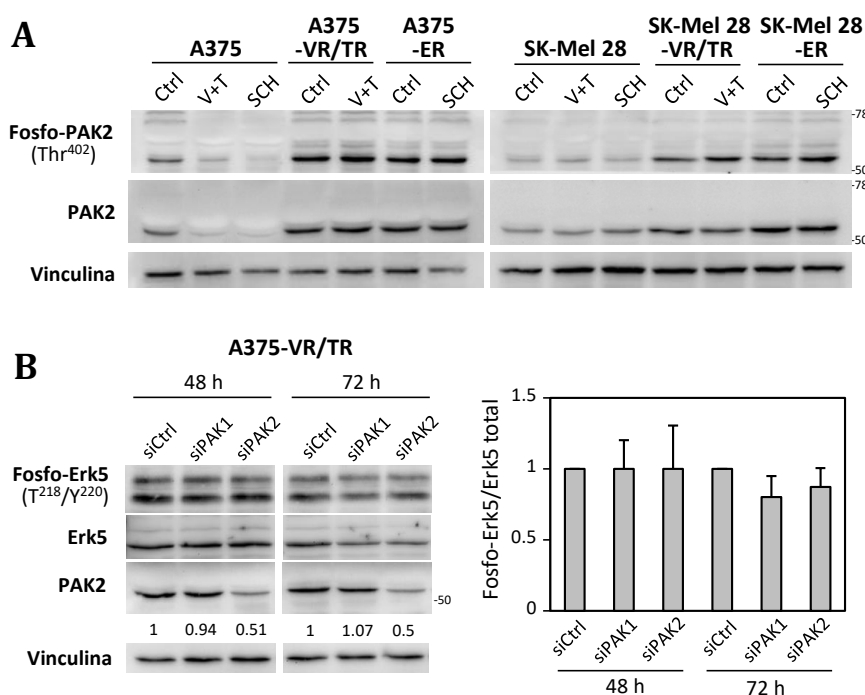


Figura 49. Análisis de la expresión y fosforilación de PAK2 y de su posible papel en la fosforilación de Erk5 en células A375-VR/TR. (A) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de 1 μ M de VMF y 50 nM de TMT (V+T), o 200 nM de SCH, y posteriormente sometidas a *western blotting*. (B) Las células A375-VR/TR fueron transfectadas con siRNA para PAK1 (siPAK1), PAK2 (siPAK2), o bien con un siRNA control (siCtrl). Tras 48 y 72 horas, la expresión de PAK2 y la fosforilación de Erk5 (110-115 kD) fueron determinadas por *immunoblotting*. Los valores situados debajo de los geles muestran la cuantificación del silenciamiento, mientras que la gráfica de la derecha indica la media de la relación densitométrica entre las bandas de fosfo-Erk5 y Erk5 total (n=3).

De modo similar a las células A375-VR/TR, la disminución de la expresión de PAK2 en las células resistentes a SCH no afectó a la fosforilación de Erk5 (**Figura 50**).

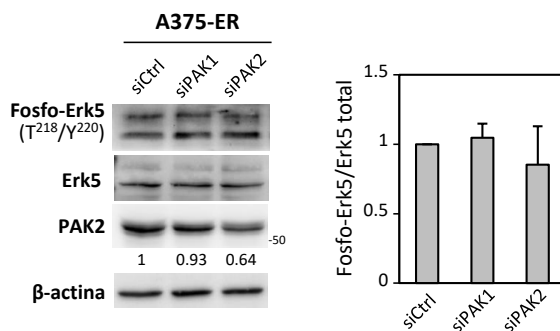


Figura 50. Análisis de la posible implicación de PAK2 en la fosforilación de Erk5 en células A375-ER. Las células fueron transfectadas con siRNA para PAK1 (siPAK1), PAK2 (siPAK2), o con siRNA control (siCtrl), y analizadas por *western blotting*. Los valores situados debajo de los geles muestran la cuantificación del silenciamiento, mientras que la gráfica de la derecha indica la media de la relación densitométrica entre las bandas de fosfo-Erk5 y Erk5 total (n=2).

Asociado al mantenimiento de la activación de Erk5 en las células A375-VR/TR silenciadas para PAK2, éstas no disminuyeron su proliferación en comparación con los transfectantes control, tanto en ausencia como en presencia de vemurafenib y trametinib (**Figura 51**).

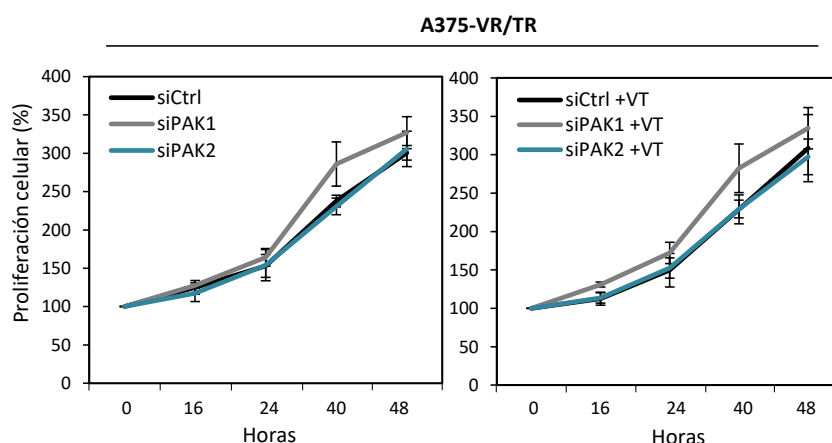


Figura 51. Proliferación de las células A375-VR/TR tras el silenciamiento de PAK2. Las células A375-VR/TR fueron transfectadas con siRNA para PAK1 (siPAK1), PAK2 (siPAK2), o con siRNA control (siCtrl), y tras 24 horas, fueron incubadas en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) de 1 μ M de VMF y 50 nM de TMT (VT) durante los tiempos indicados, para posteriormente analizar su capacidad proliferativa mediante ensayos de CCK-8 (n=3). Se muestran los datos referidos al inicio del experimento (0 horas, 100%).

En conjunto, estos resultados indican que PAK2 no estaría implicada en la activación de la vía MEK5-Erk5 en las células A375-VR/TR y A375-ER, y sugieren que no jugaría un papel relevante en la resistencia a vemurafenib y trametinib.

2.13. Identificación de receptores tirosina quinasa activados en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK

La vía MEK5-Erk5 se encuentra regulada por la activación de RTKs (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; Hoang *et al.*, 2017). Con el objetivo de determinar si existían diferencias en la activación de RTKs entre las células A375 y A375-ER que pudieran ser responsables del aumento de activación de Erk5 en las células resistentes, empleamos *arrays* para la detección de RTKs fosforilados en tirosinas. De esta manera, observamos un incremento de la fosforilación de ErbB2, IGF-1R, Insulin-R (IR), ALK y Dtk en las células A375-ER con respecto a las células A375, mientras que la activación de EGFR y AXL se encontraba disminuida, no detectándose cambios en la activación de HGFR (Figura 52A). Además, detectamos alteraciones en la fosforilación de otros RTKs, como ErbB4, FGFR3 y c-Ret (Figura 52B), aunque su nivel de activación fue inferior al de los RTKs mostrados en la Figura 52A.

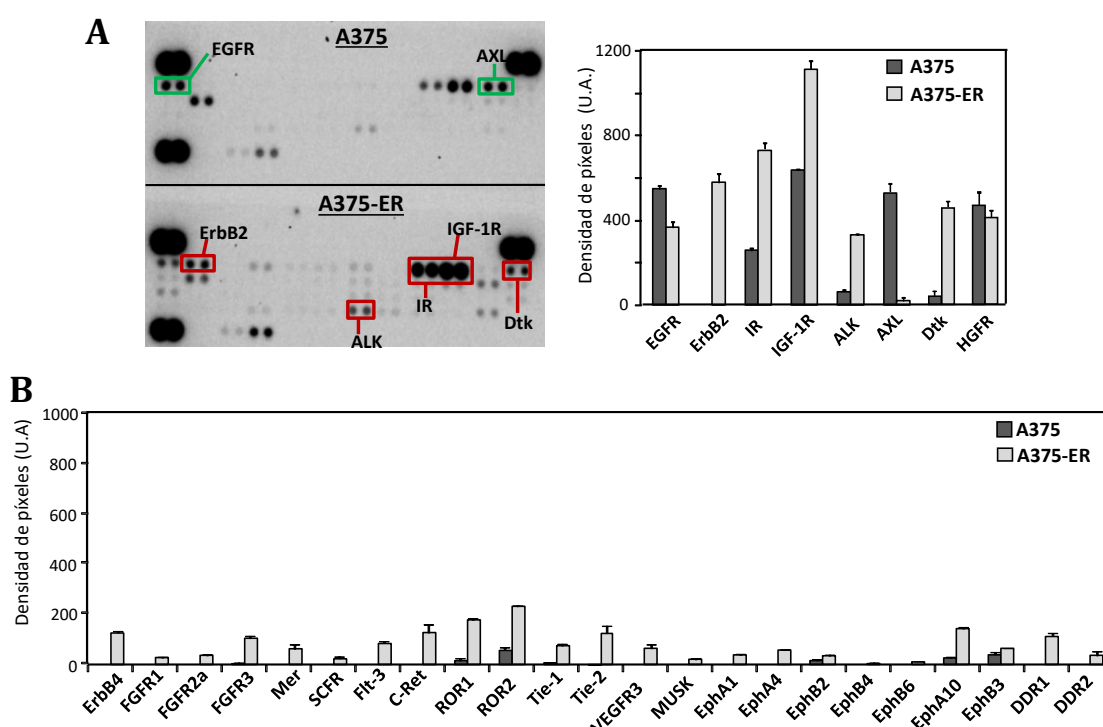


Figura 52. Análisis de la fosforilación de RTKs en células parentales y resistentes a SCH. (A) La fosforilación de RTKs en las células A375 y A375-ER fue determinada mediante *arrays*. A la izquierda se muestran los RTKs cuya fosforilación se encuentra disminuida (en verde), o incrementada (en rojo) en las células resistentes. A la derecha se presenta la cuantificación densitométrica de los *dots* con mayor intensidad de señal (en las células parentales o en las resistentes), correspondiente a un experimento representativo (n=2). (B) Cuantificación densitométrica de RTKs no mostrados en (A), y que presentan menores niveles de fosforilación. No se muestran los RTKs cuya fosforilación no fue detectada o fue demasiado baja para su cuantificación.

Debido al importante aumento en la fosforilación de ErbB2 observado en las células A375-ER (Figura 52A), quisimos estudiar si ErbB2 pudiera estar implicado en la resistencia a SCH. Para ello, empleamos los inhibidores de ErbB2 lapatinib y trastuzumab, ambos aprobados para el uso en pacientes con cáncer de mama. El tratamiento con lapatinib no afectó a la viabilidad de las células A375 ni A375-ER, ni tampoco a las células SK-Mel 28 y SK-Mel 28-ER (Figura 53A). Además, la combinación de lapatinib con SCH no

consiguió disminuir la viabilidad de las células resistentes (**Figura 53B**). De forma similar, el anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 trastuzumab, en monoterapia o en combinación con SCH, no redujo la viabilidad de las células A375-ER (**Figura 53C**). Estos resultados sugieren que la resistencia a SCH de las células A375-ER es independiente del incremento de activación de ErbB2.

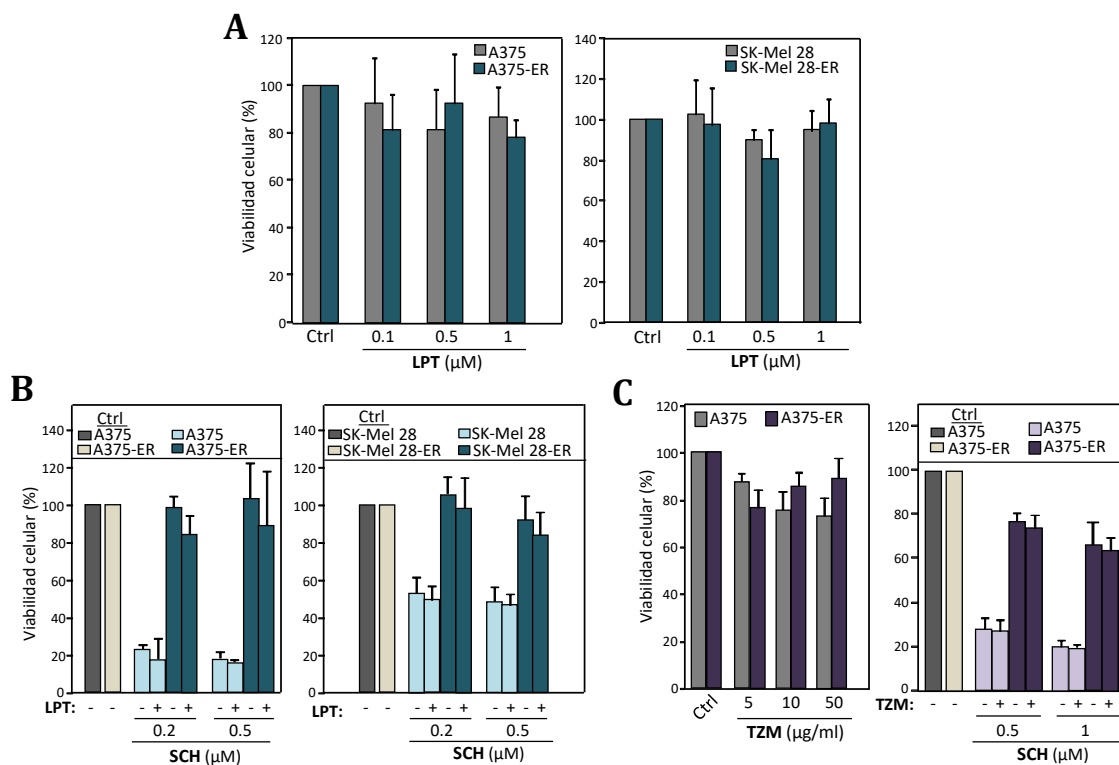


Figura 53. La resistencia a SCH de las células A375-ER es independiente del aumento de la activación de ErbB2. Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de lapatinib (LPT) (A; n=5), o de SCH o de la combinación de SCH con 1 μM de LPT (B; n=3-4), y posteriormente testadas en ensayos de MTT. (C) La viabilidad de las células fue determinada empleando MTT, tras el tratamiento durante 48 horas con las concentraciones indicadas de trastuzumab (TZM, izquierda), o con SCH solo o combinado con TZM (20 μg/ml)(n=3-5).

El factor de crecimiento IGF-1 contribuye a la proliferación y la supervivencia de las células de melanoma (Satyamoorthy *et al.*, 2001), y su receptor IGF-1R ha sido relacionado con resistencia a la inhibición de BRAF (Villanueva *et al.*, 2010; Wang, Sinnberg *et al.*, 2015). Puesto que las células A375-ER mostraron un incremento de IGF-1R fosforilado (ver **Figura 52A**), decidimos estudiar la activación de este receptor en las células resistentes, así como su posible implicación en la resistencia. Ensayos de *western blotting* revelaron que las células A375-ER presentaban un aumento en la fosforilación de IGF-1R en Tyr1131 (**Figura 54A**), el cual constituye un sitio de auto-fosforilación que contribuye a la activación del RTK (Hernández-Sánchez *et al.*, 1995). Asimismo, observamos que este aumento de fosforilación también ocurría en las células A375-VR/TR y A375-VR/ER, así como en las células SK-Mel 28-ER, SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-VR/ER (**Figura 54A**). Adicionalmente, todas las células resistentes analizadas mostraron mayores niveles de expresión de la proteína IGF-1R, en comparación con las células parentales (**Figura 54A**). El tratamiento de las células A375 con SCH o con vemurafenib no aumentó la fosforilación ni la expresión de IGF-1R (**Figura 54B**), sugiriendo que el incremento de activación de IGF1R observado en las células resistentes no era una

respuesta adaptativa temprana como consecuencia de la inhibición de la vía MAPK/ERK. En cuanto al mRNA de *IGF-1R*, detectamos mayores niveles de expresión en las células A375-ER que en las A375, pero no observamos diferencias significativas entre las células SK-Mel 28-ER y SK-Mel 28 (**Figura 54C**), indicando que la sobreexpresión de IGF-1R en las células SK-Mel 28-ER sería independiente de un incremento de transcripción. Para determinar si existían diferencias en la estabilidad de IGF-1R, inhibimos la síntesis proteica en las células parentales y resistentes a SCH mediante el tratamiento con cicloheximida. Los resultados revelaron una disminución de los niveles de IGF-1R en las células A375 y SK-Mel 28 tras 12 y 24 horas de exposición a cicloheximida, mientras que el nivel de expresión de IGF-1R se mantuvo en las células A375-ER y SK-Mel 28-ER (**Figura 54D**). Estos resultados sugieren que la elevada estabilidad de IGF-1R contribuiría a su aumento de expresión en las células resistentes a SCH.

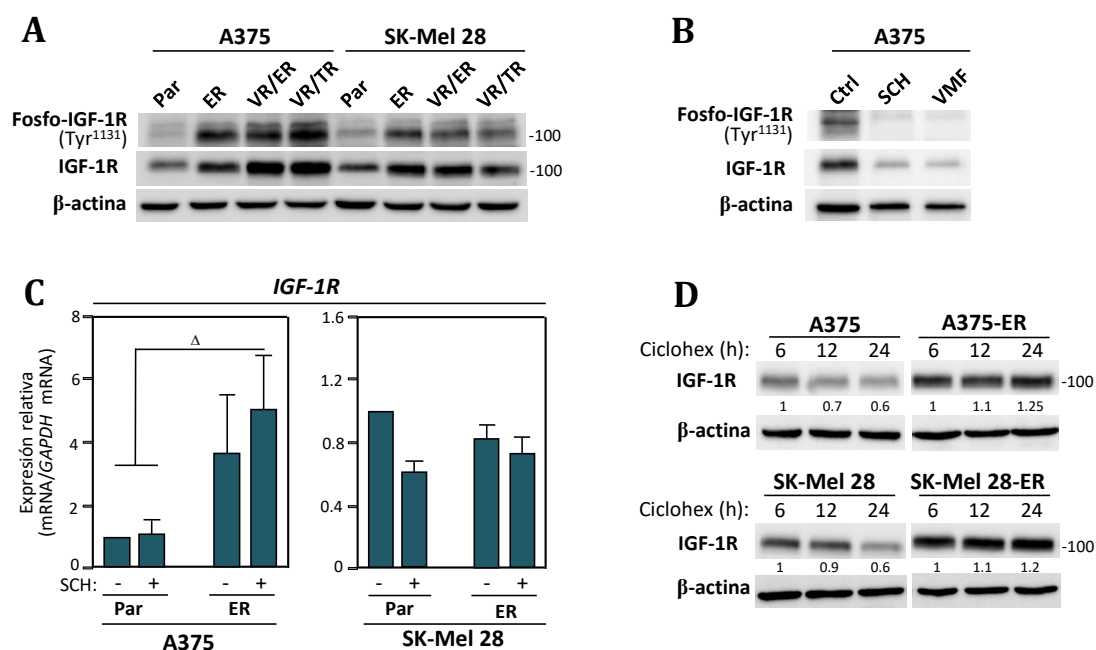


Figura 54. Análisis de la expresión y activación de IGF-1R en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. (A, B) Las células parentales (Par) y resistentes fueron incubadas durante 48 horas en ausencia de inhibidores (A), o en presencia de 200 nM de SCH o 1 μ M de VMF (B), y posteriormente analizadas por *immunoblotting*. (C) Análisis mediante qPCR de la expresión de *IGF-1R* tras el tratamiento durante 48 horas de las células con 200 nM de SCH (n=3; $\Delta p < 0.05$). (D) Las células fueron incubadas con cicloheximida (Ciclohex; 150 μ g/ml) durante los tiempos indicados y sometidas a *western blotting*. Los valores situados debajo de los geles indican la cuantificación densitométrica de las bandas (n=3-4).

Se ha descrito que BRAF regula positivamente la expresión de IGF-1R de forma independiente de la activación de Erk1/2 (Wang, Sinnberg *et al.*, 2015). Las células A375-ER, A375-VR/TR y A375-VR/ER, y las células SK-Mel 28-ER mostraron niveles de expresión de BRAF superiores a los de las células parentales correspondientes (**Figura 55A**), por lo que analizamos la posible implicación de BRAF en el incremento de IGF-1R en estas células resistentes. Para ello, silenciamos de forma transitoria la expresión de BRAF en las células A375-ER, no observando cambios importantes en los niveles de expresión de IGF-1R con respecto a los transfectantes control (**Figura 55B**). De modo similar, el tratamiento con cicloheximida tampoco alteró sustancialmente la estabilidad de IGF-1R en

las células silenciadas para BRAF (**Figura 55C**). Estos resultados indican que el aumento de expresión de IGF-1R en las células resistentes a SCH es independiente de BRAF.

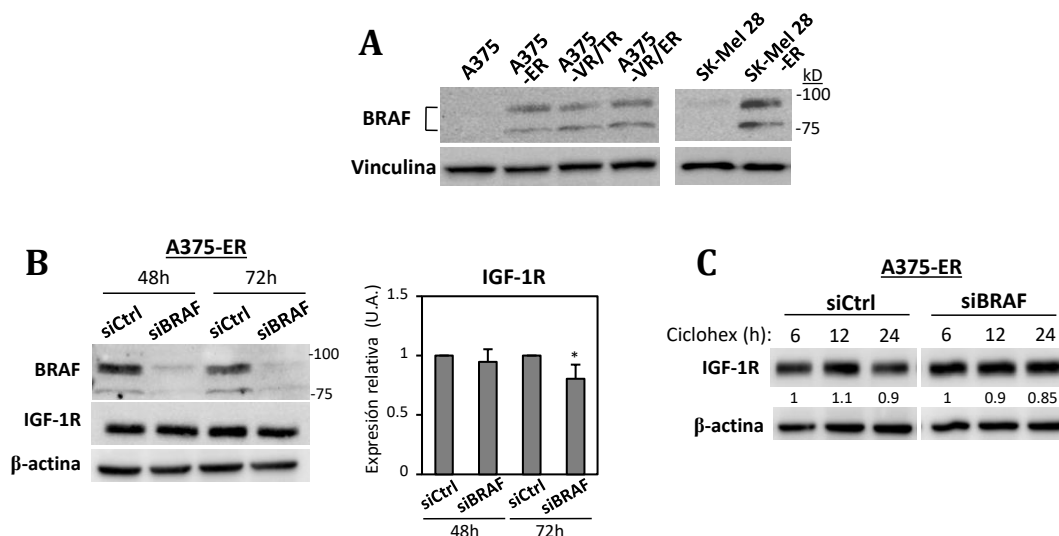


Figura 55. Análisis de la expresión de BRAF y de su posible implicación en la regulación de la expresión de IGF-1R en células resistentes. (A) Análisis por *western blotting* de la expresión de BRAF en células parentales y resistentes en ausencia de inhibidores. (B) Las células fueron transfectadas con siRNA para BRAF (siBRAF), o con siRNA control (siCtrl), y tras 48 y 72 horas, la expresión de IGF-1R y BRAF fue analizada por *immunoblotting*. Se muestra la media de la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a IGF-1R (n=3; *p<0.05). (C) Los transfectantes fueron incubados con cicloheximida (Ciclohex; 150 µg/ml) durante los tiempos indicados, y posteriormente testados por *immunoblotting*. Los valores indican la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=3).

2.14. Estudio del papel de IGF-1R en resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK

Con el objetivo de determinar si la activación de IGF-1R estaba involucrada en la resistencia a SCH, tratamos las células parentales y resistentes con el inhibidor de IGF-1R linsitinib (LST), lo que se tradujo en una disminución de la fosforilación de IGF-1R (Tyr1131) en ambos tipos celulares (**Figura 56A**). Ensayos de MTT revelaron que las células A375-ER y SK-Mel 28-ER tienen una sensibilidad al tratamiento con LST superior a la observada en las células parentales (**Figura 56B**), y la combinación de LST con SCH redujo notablemente la viabilidad de las células resistentes con respecto al tratamiento monoterapia con SCH (**Figura 56C**). Asimismo, el tratamiento con ambos inhibidores (LST y SCH) disminuyó todavía más la viabilidad de las células parentales, en comparación con el inhibidor de ERK solo (**Figura 56C**). Por otra parte, la viabilidad de las células A375-VR/TR y A375-VR/ER también se vio significativamente afectada por la inhibición de IGF-1R, así como por el tratamiento combinado de LST con vemurafenib y trametinib, o con vemurafenib y SCH, respectivamente (**Figura 56D**).

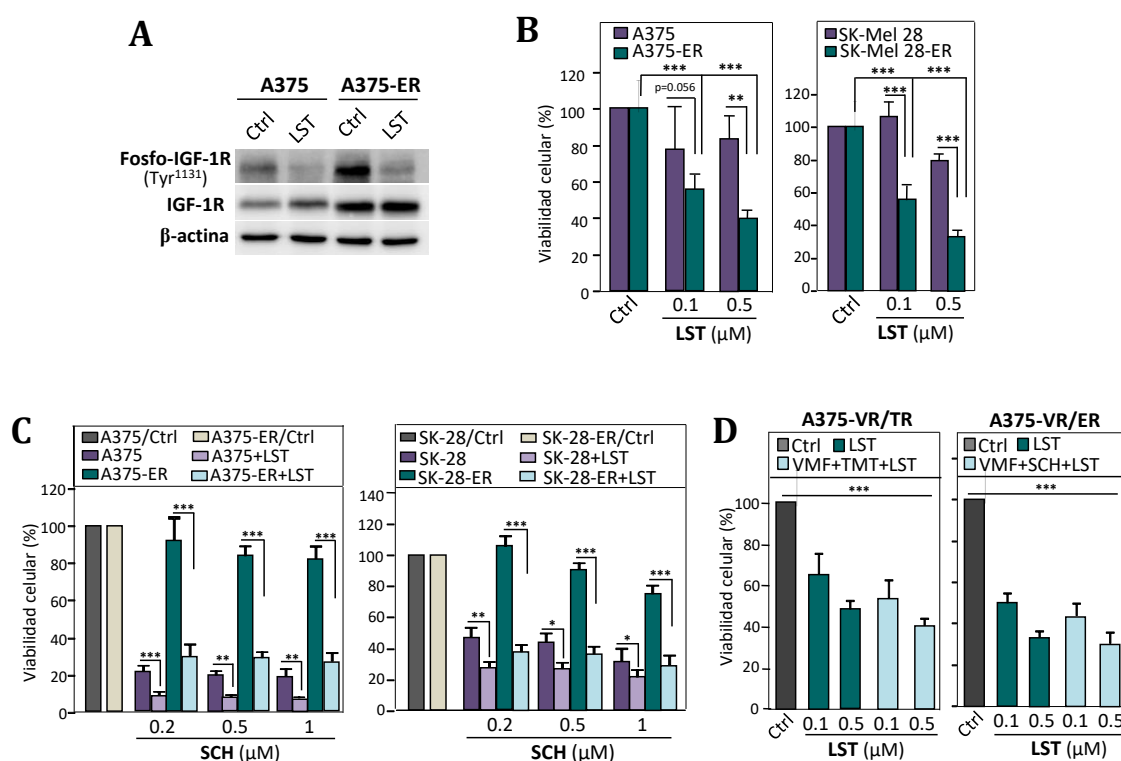


Figura 56. La inhibición de IGF-1R reduce la resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK. (A) Las células fueron tratadas con linsitinib (LST; 500 nM) durante 48 horas, y la fosforilación de IGF-1R (Tyr¹¹³¹) analizada por *western blotting*. (B-D) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia o en presencia de los inhibidores indicados, y su viabilidad determinada en ensayos de MTT. Para los tratamientos combinados, las concentraciones empleadas fueron: 500 nM de LST (C), y 1 μM de VMF, 50 nM de TMT o 200 nM de SCH (D). Se muestran los datos referidos a las células sin tratamiento (Ctrl, 100%; n=4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

El cultivo celular 3D proporciona un modelo más cercano a un tumor *in vivo* que los cultivos celulares en monocapa (2D), por lo que analizamos el efecto del inhibidor de IGF-1R en el crecimiento de esferoides formados por las células A375 parentales y resistentes. En presencia de las proteínas de matriz extracelular presentes en el medio de cultivo para la formación de esferoides, las células A375-ER, A375-VR/TR y A375-VR/ER dieron lugar a esferoides más definidos y de mayor tamaño que los derivados de células A375 (**Figura 57A**). Estos datos coinciden con la mayor capacidad de crecimiento independiente de adhesión de las células resistentes a SCH (ver **Figura 17B, C**). El tratamiento con LST disminuyó significativamente el crecimiento de los esferoides de células resistentes, en comparación con sus respectivos controles sin inhibidor, pero no afectó a los esferoides de células A375 (**Figura 57B**). Asimismo, la reducción del tamaño de los esferoides de células resistentes causada por LST se correlacionó con una menor viabilidad de los mismos, la cual fue analizada mediante ensayos de MTT tras finalizar el experimento (**Figura 57C**). Por el contrario, no detectamos alteraciones significativas en la viabilidad de los esferoides de células A375 tratados con LST, con respecto a los controles sin tratamiento (**Figura 57C**).

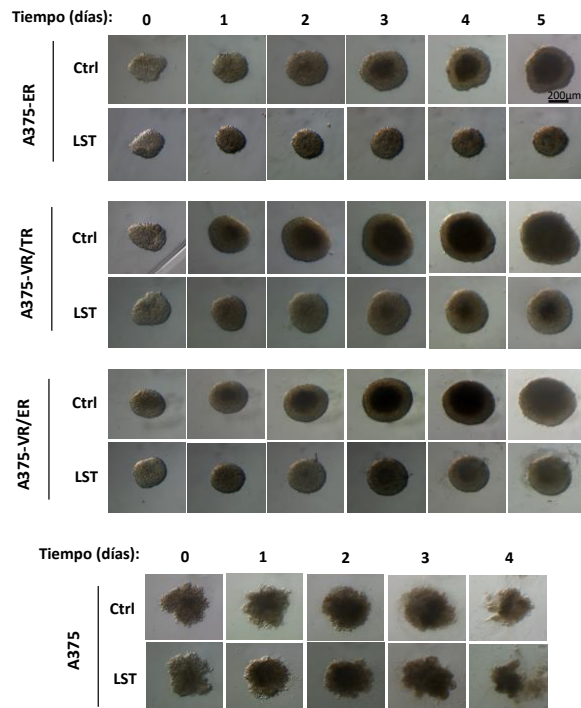
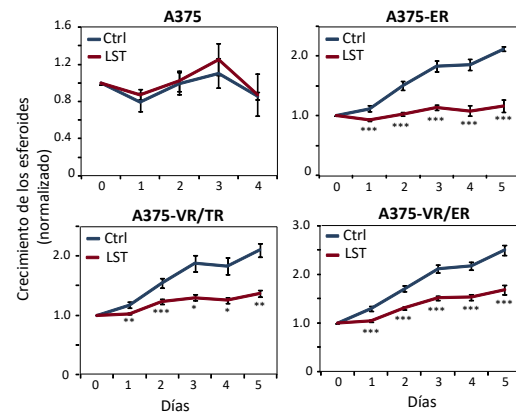
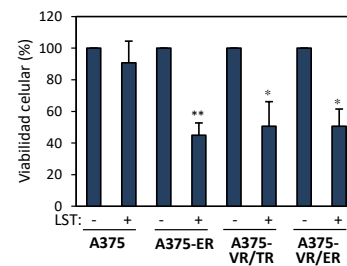
A**B****C**

Figura 57. Efecto de la inhibición de IGF-1R en el crecimiento celular 3D. (A) Formación y crecimiento de esferoides derivados de las células indicadas, en ausencia (Ctrl, DMSO) o en presencia de LST (1 µM) durante 4-5 días. (B) Cuantificación del área de los esferoides mostrados en (A), normalizado al día de inicio del tratamiento (día 0; n=7; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). (C) Viabilidad de los esferoides mostrados en (A), analizada mediante ensayos de MTT al final de cada experimento (n=7; *p<0.05; **p<0.01).

Posteriormente, inoculamos las células A375 y A375-ER en ratones inmunodeficientes NSG, y cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100 mm³, los ratones fueron tratados con LST o con vehículo. De esta manera, observamos que el tratamiento con LST disminuyó significativamente el crecimiento *in vivo* de las células A375-ER con respecto a los ratones tratados con el vehículo (**Figura 58**). Concordando con los resultados obtenidos *in vitro*, el LST no afectó al crecimiento de los tumores de células A375 (**Figura 58**). Cabe destacar la mayor tasa de crecimiento de los tumores de células A375-ER que los formados por las células parentales, resultado que coincide con la mayor capacidad de crecimiento de los esferoides de células resistentes.

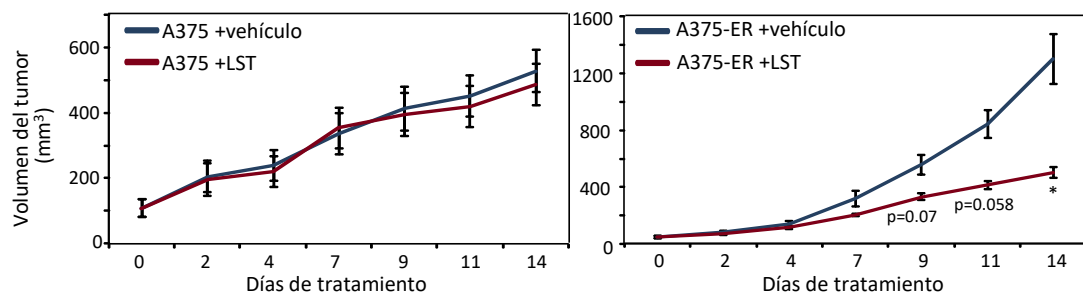


Figura 58. Inhibición por LST del crecimiento *in vivo* de tumores de células resistentes a SCH. Análisis del crecimiento subcutáneo de las células A375 y A375-ER en ratones NSG tratados con LST (40 mg/kg) o vehículo. Las barras de error muestran el SEM (n=8-10; *p<0.05).

2.15. La activación de MEK5-Erk5 y PI3K-Akt en las células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK depende de la estimulación *upstream* de IGF-1R

A continuación, estudiamos si la activación de Erk5 podría estar regulada por IGF-1R en las células con resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Puesto que los RTKs como IGF-1R pueden activar a Ras (Iams y Lovly, 2015), determinamos en primer lugar los niveles de activación de Ras tras la inhibición de IGF-1R. Los ensayos de actividad GTPasa revelaron una moderada reducción del 35-45% de los niveles de Ras activo en las células A375-ER tras la exposición a LST (**Figura 59A**). Asimismo, el tratamiento con LST causó una importante inhibición de la fosforilación de Erk5 en las células A375-ER (**Figura 59B**), así como en las células A375-VR/TR, A375-VR/ER, SK-Mel 28-ER, SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-VR/ER (**Figura 59C**). La inhibición de IGF-1R no afectó a la fosforilación de Erk1/2 en las células A375 parentales (**Figura 59B**), sugiriendo que IGF-1R señala preferentemente a través de MEK5-Erk5 y no de Erk1/2 en las células resistentes a SCH.

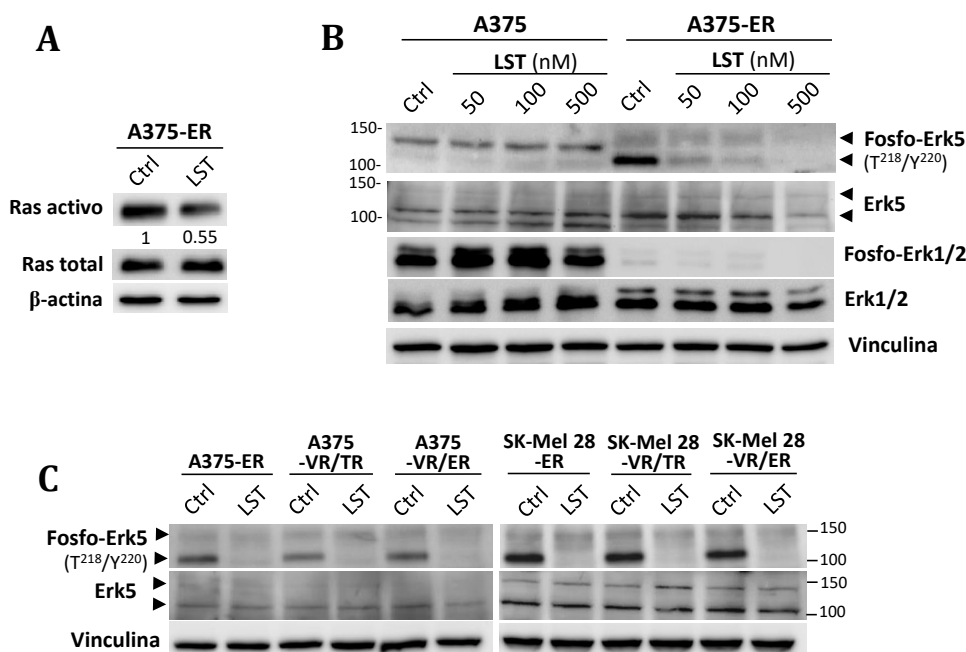


Figura 59. Activación de Ras y Erk5 dependiente de IGF-1R en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. (A) Ensayos de actividad GTPasa para detectar Ras activo en células A375-ER tras el tratamiento con LST (500 nM; 48 horas). Los valores indican la cuantificación densitométrica de las bandas, referida a las células sin tratamiento (Ctrl; n=4). Se muestra un resultado representativo. (B, C) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de las concentraciones indicadas de LST (B), o de 500 nM de LST (C), y posteriormente analizadas por *western blotting*.

La señalización originada tras la estimulación de IGF-1R puede activar la vía PI3K/Akt (Iams y Lovly, 2015), y se ha demostrado que el aumento de la activación de IGF-1R se correlaciona con un incremento de fosfo-Akt en células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF (Villanueva *et al.*, 2010). En concordancia con estos datos previos, los niveles de fosforilación de Akt disminuyeron tras el tratamiento con LST, tanto en las células A375 parentales (**Figura 60A**) como en las resistentes (**Figura 60A, B**). No obstante, debido a que la inhibición de Akt con triciribina causó únicamente una pequeña reducción de la viabilidad de las células A375-ER (ver **Figura 25**), los resultados indican

que la activación de IGF-1R induce resistencia a los inhibidores de la vía MAPK/ERK mayoritariamente mediante la activación de MEK5-Erk5.

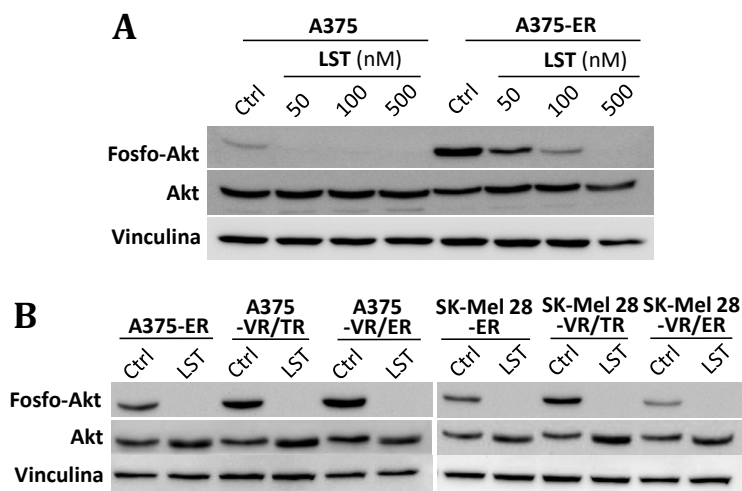


Figura 60. Activación de Akt dependiente de IGF-1R en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de las concentraciones indicadas de LST (A), o de 500 nM de LST (B), y sometidas a *immunoblotting* para el análisis de la fosforilación de Akt.

2.16. Recuperación de fosfo-Erk1/2 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Caracterización molecular.

Las células resistentes a SCH no requieren la presencia continua del inhibidor para mantener su resistencia (ver **Figura 14**). Además, tras 3 semanas en cultivo en ausencia de SCH, las células resistentes retuvieron bajos niveles de fosforilación de Erk1/2 (**Figura 61**), indicando que la inhibición de dicha fosforilación no presenta dependencia de SCH.

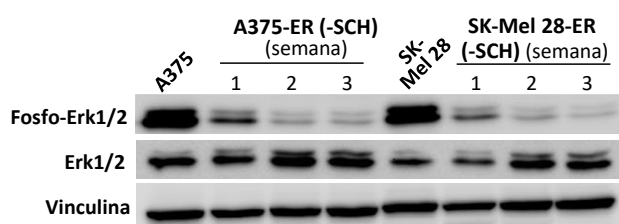


Figura 61. Mantenimiento de la inhibición de la fosforilación de Erk1/2 en células resistentes a SCH en ausencia del inhibidor. Las células fueron cultivadas en ausencia de SCH (-SCH) durante los tiempos indicados, y analizadas por *immunoblotting*.

Para examinar la posibilidad de que existieran diferencias en la expresión de factores de crecimiento en el medio condicionado de las células parentales y resistentes que pudieran influir en la distinta activación de Erk1/2, incubamos durante 8 horas las células resistentes a SCH con el medio condicionado durante 48 horas por las células parentales, y viceversa, analizando posteriormente los niveles de fosfo-Erk1/2. Los resultados revelaron una notable recuperación de la fosforilación de Erk1/2 en las células A375-ER y, en menor medida, en las células SK-Mel 28-ER, tras su exposición al sobrenadante obtenido del cultivo de las células A375 y SK-Mel 28, respectivamente (**Figura 62A**). Por otra parte, fosfo-Erk1/2 disminuyó ligeramente en las células A375 incubadas con el medio condicionado por las células A375-ER, aunque esto no ocurrió en

las células SK-Mel 28 tratadas con el sobrenadante de sus correspondientes células resistentes (**Figura 62A**). La recuperación de fosfo-Erk1/2 detectada en las células A375-ER se correlacionó con una disminución de la fosforilación de Erk5 y de IGF-1R, aunque los niveles de dichas fosforilaciones continuaron siendo superiores a los mostrados por las células A375 (**Figura 62A, B**). La reducción de la fosforilación de Erk5 no fue observada en las células SK-Mel 28-ER expuestas al medio condicionado por las células SK-Mel 28 (**Figura 62A**), sugiriendo la posibilidad de que se requiera un mayor grado de activación de Erk1/2 para obtener una inhibición detectable de la fosforilación de Erk5.

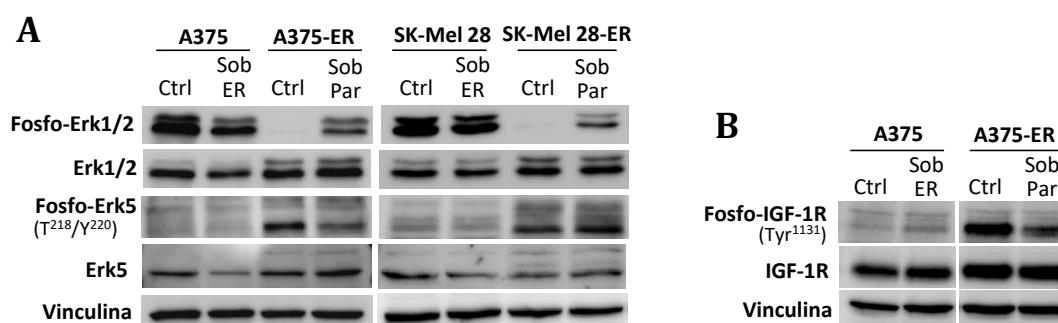


Figura 62. Recuperación de fosfo-Erk1/2 en las células resistentes a SCH tras la incubación con el medio condicionado por las células parentales. Las células resistentes fueron incubadas con el sobrenadante obtenido de cultivos de 48 horas de las células parentales (Sob Par) y, de la misma manera, las células parentales fueron tratadas con el sobrenadante de las células resistentes a SCH (Sob ER). Tras 8 horas de incubación, la activación de Erk1/2 y Erk5 (A), y de IGF-1R (B), fue determinada por *western blotting*. Los experimentos se realizaron en ausencia de SCH. Las células control (Ctrl) corresponden a un cultivo de 48 horas cuyo sobrenadante no fue reemplazado.

Estos resultados sugerían que podía haber diferencias en los niveles de expresión de factores de crecimiento entre las células parentales y resistentes, por lo que analizamos mediante *arrays* la expresión de 40 factores de crecimiento en el sobrenadante de las células A375 y A375-ER. El medio condicionado por las células resistentes a SCH mostró un notable aumento de los niveles de PDGF-AA y una disminución de la expresión de VEGF, con respecto al sobrenadante de las células parentales (**Figura 63**). Asimismo, detectamos una disminución de la expresión de TGF- α , y en menor medida de HGF, en las células resistentes, mientras que otros factores como EGF, IGF-1, IGF-2 o IGFBP2 no sufrieron alteraciones remarcables (**Figura 63**).

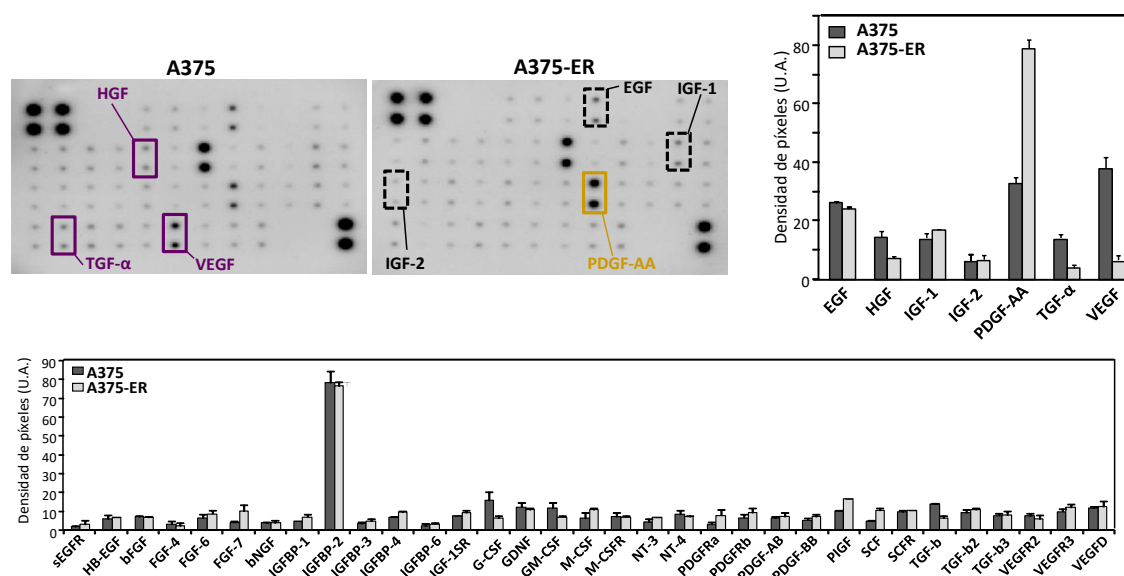


Figura 63. Factores de crecimiento secretados por las células A375 y A375-ER. Las células fueron incubadas en ausencia de SCH, y tras 48 horas, se determinó la expresión de factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo. Los resultados de los *arrays* mostrados en la parte superior izquierda señalan factores de crecimiento cuya expresión se encuentra disminuida (morado), incrementada (amarillo) o inalterada (negro) en las células resistentes con respecto a las parentales. Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de los *dots* de un experimento representativo (n=2).

Dado el bajo nivel de fosforilación de los receptores de PDGF-AA y de VEGF (PDGFR α , VEGFR1, VEGFR2; no mostrados en **Figura 52** por su bajo nivel de señal) tanto en las células parentales como en las resistentes, era poco probable que estos factores estuvieran implicados en la reducción de fosfo-Erk1/2 observada en las células resistentes. En el caso de VEGF, esta hipótesis resultó ser cierta, ya que la incubación de las células resistentes con VEGF no recuperó la fosforilación de Erk1/2 (**Figura 64A**).

La reducción de la expresión de TGF- α en el sobrenadante de las células A375-ER coincidía con una menor activación de su receptor EGFR (ver **Figura 52A**), y notablemente, el tratamiento de las células A375-ER y SK-Mel 28-ER con TGF- α permitió recuperar la fosforilación de Erk1/2 hasta unos niveles similares a los obtenidos tras la incubación con el sobrenadante de las células parentales (**Figura 64A**). No obstante, la fosforilación de Erk5 no varió de forma significativa en respuesta a TGF- α en las células resistentes a SCH (**Figura 64A**). La recuperación de los niveles de fosfo-Erk1/2 fue asimismo observada en las células A375-VR/TR y SK-Mel 28-VR/TR incubadas con el sobrenadante de las células parentales correspondientes o con TGF- α , mientras que fosfo-Erk1/2 disminuyó levemente en las células parentales expuestas al medio condicionado por las células resistentes a vemurafenib y trametinib (**Figura 64B**).

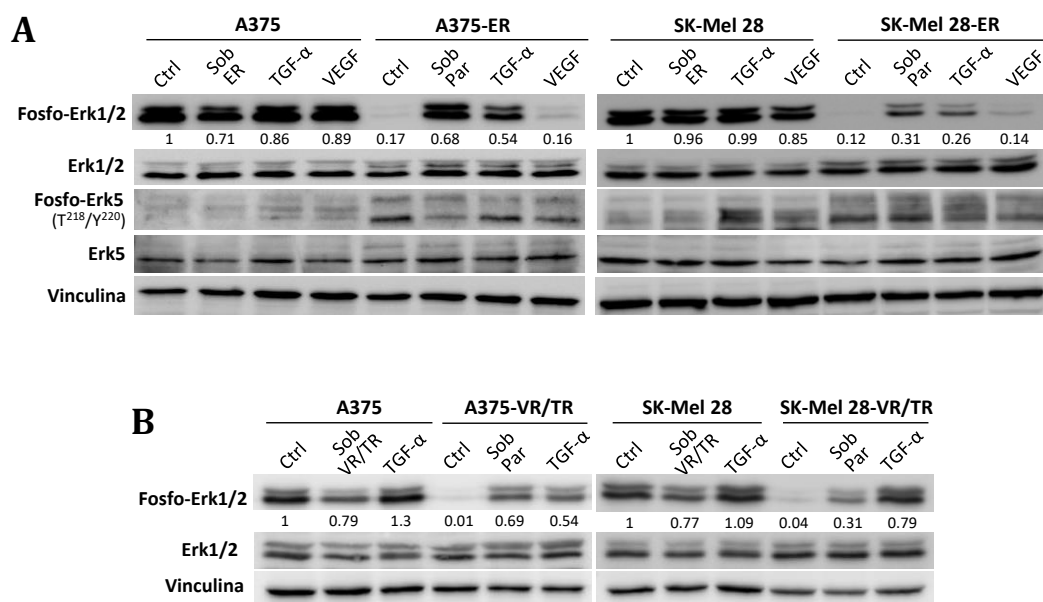


Figura 64. Recuperación de fosfo-Erk1/2 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK tras la incubación con TGF- α . (A, B) Las células fueron incubadas durante 8 horas con los sobrenadantes indicados (Sob ER, sobrenadante de células resistentes a SCH; Sob Par, sobrenadante de células parentales; Sob VR/TR, sobrenadante de células resistentes a vemurafenib y trametinib), con TGF- α (15 ng/ml) o con VEGF (50 ng/ml), y analizadas por *western blotting*. Los valores situados debajo de los geles indican las cuantificaciones densitométricas de las bandas, referidas a las células parentales sin tratar (Ctrl; n=2-3).

Para determinar si la recuperación de fosfo-Erk1/2 en las células resistentes tras la incubación con el sobrenadante de las células parentales era mediada por TGF- α , expusimos las células A375-ER y A375-VR/TR al medio condicionado por las células parentales en presencia de un anticuerpo bloqueante de TGF- α . De esta manera, observamos que la neutralización de TGF- α en el sobrenadante de las células A375 impedía, en gran medida, la recuperación de fosfo-Erk1/2 en las células A375-ER y A375-VR/TR, con respecto al anticuerpo control (**Figura 65**). No obstante, el anticuerpo anti-TGF- α no alteró de forma significativa la fosforilación de Erk1/2 en las células parentales (**Figura 65**), indicando que la activación de Erk1/2 en las células parentales A375 sería mayoritariamente independiente de la señalización mediada por TGF- α .

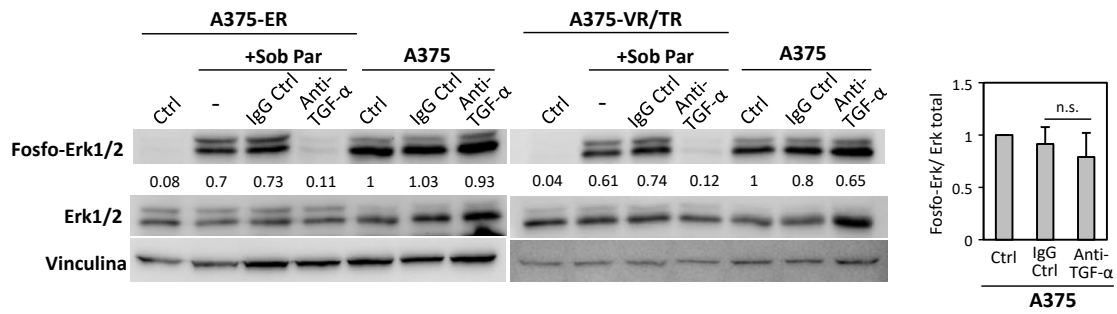


Figura 65. Efecto de la neutralización de TGF-α en la recuperación de fosfo-Erk1/2 en células resistentes. Las células resistentes fueron incubadas durante 8 horas con el sobrenadante de las células parentales (Sob Par), en ausencia o en presencia de un anticuerpo control (IgG Ctrl, 0.5 µg/ml) o de un anticuerpo bloqueante de TGF-α (anti-TGF-α, 0.5 µg/ml), y analizadas por *western blotting*. Asimismo, las células A375 fueron incubadas con el anticuerpo control o anti-TGFα. Los valores indican la cuantificación densitométrica de las bandas de fosfo-Erk1/2 referida a las células A375 sin anticuerpo (Ctrl; n=2). La gráfica representa la media y la desviación estándar de la cuantificación de fosfo-Erk1/2 en células A375, referida a las células sin anticuerpo (Ctrl; n=4).

Las células A375-ER, A375-VR/TR, SK-Mel 28-ER y SK-Mel 28-VR/TR mostraron niveles de expresión de EGFR, tanto de mRNA como de proteína, muy superiores con respecto a las correspondientes células parentales (**Figura 66A, B**). La baja expresión de EGFR en las células A375 y SK-Mel 28 podría explicar, al menos en parte, su insensibilidad a la estimulación con TGF-α, en comparación con las células resistentes.

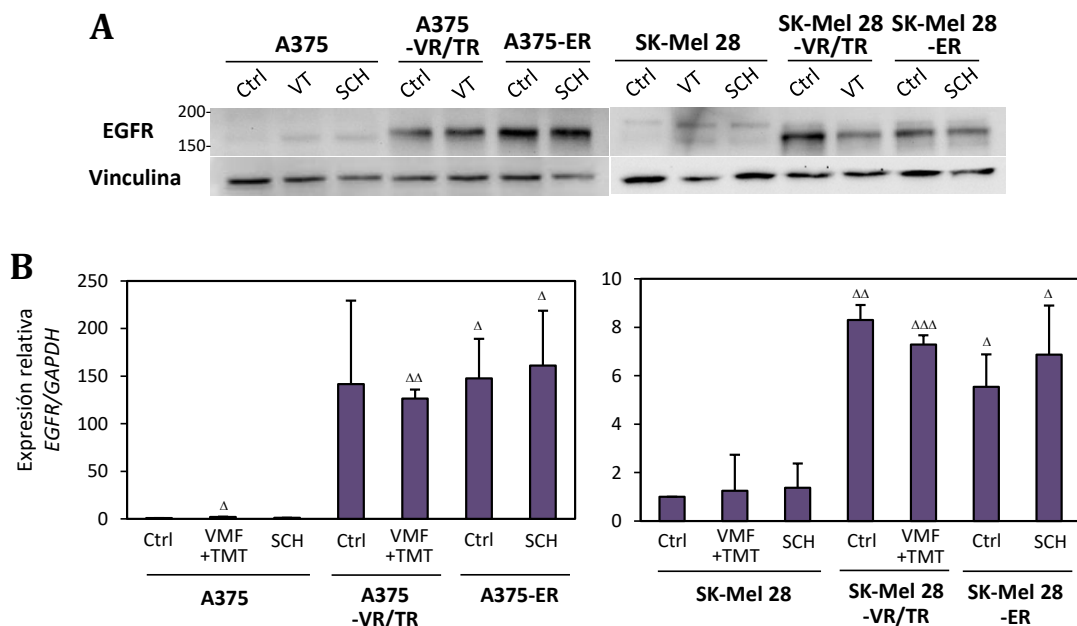


Figura 66. Expresión de EGFR en células parentales y resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de VMF (parentales, 100 nM; resistentes, 1 µM) y TMT (parentales, 5 nM; resistentes, 50 nM) (VT), o 200 nM de SCH, y analizadas por *western blotting* (A), o por qPCR (B) (n=2-3; Δp<0.05; ΔΔp<0.01; ΔΔΔp<0.001).

Notablemente, el tratamiento de las células A375-ER y A375-VR/TR con el inhibidor de EGFR erlotinib revirtió la fosforilación de Erk1/2 estimulada por TGF-α (**Figura 67**), mostrando que la recuperación de fosfo-Erk1/2 en estas células se produce

tras la unión de TGF- α a EGFR. De forma similar al anticuerpo bloqueante de TGF- α , el tratamiento de las células A375 parentales con erlotinib tampoco alteró el nivel de fosfo-Erk1/2 (**Figura 67**).

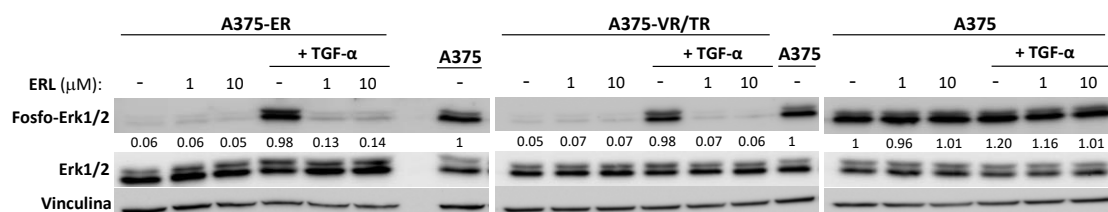


Figura 67. La inhibición de EGFR impide la recuperación de fosfo-Erk1/2 por TGF- α en células resistentes. Las células fueron pre-tratadas durante 16 horas con las concentraciones indicadas de erlotinib (ERL), y tras incubación durante 8 horas en ausencia o en presencia de TGF- α (15 ng/ml), fueron analizadas por *immunoblotting*. Se muestra la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles, referida a las células A375 sin tratamiento (n=2).

Los análisis combinados de la cinética de reactivación de Erk1/2 por TGF- α y el efecto de este factor de crecimiento en los niveles de expresión de EGFR en las células A375-ER y A375-VR/TR revelaron un rápido y transitorio aumento de la fosforilación de Erk1/2 asociado a una disminución progresiva de la expresión de EGFR (**Figura 68A**). Es de destacar que los niveles de fosfo-Erk1/2 de las células resistentes tras 6-8 horas de exposición a TGF- α se mantuvieron todavía altos con respecto al nivel basal detectado en ausencia de TGF- α . Por el contrario, la fosforilación de Erk1/2 no varió en las células A375 tratadas con TGF- α durante tiempos cortos, mientras que los bajos niveles de expresión de EGFR en estas células disminuyeron aún más tras la exposición a TGF- α (**Figura 68A**). Estos resultados revelan una rápida recuperación de fosfo-Erk1/2 por TGF- α en las células resistentes, y sugieren que la interacción EGFR/TGF- α provoca la disminución de la expresión de EGFR, posiblemente por internalización y degradación de este receptor (Haglund y Dikic, 2012). Paralelamente a la rápida reactivación de Erk1/2 por TGF- α , observamos un aumento de la fosforilación de CRAF y de MEK durante los primeros 15-30 minutos de estimulación, seguido de una disminución progresiva de estas fosforilaciones (**Figura 68B**). Esta atenuación de la activación de la vía MAPK/ERK que ocurre progresivamente tras la estimulación con TGF- α en las células resistentes probablemente se deba a mecanismos de regulación *feedback* negativa dependientes de Erk1/2, así como a la reducción de los niveles de su receptor EGFR.

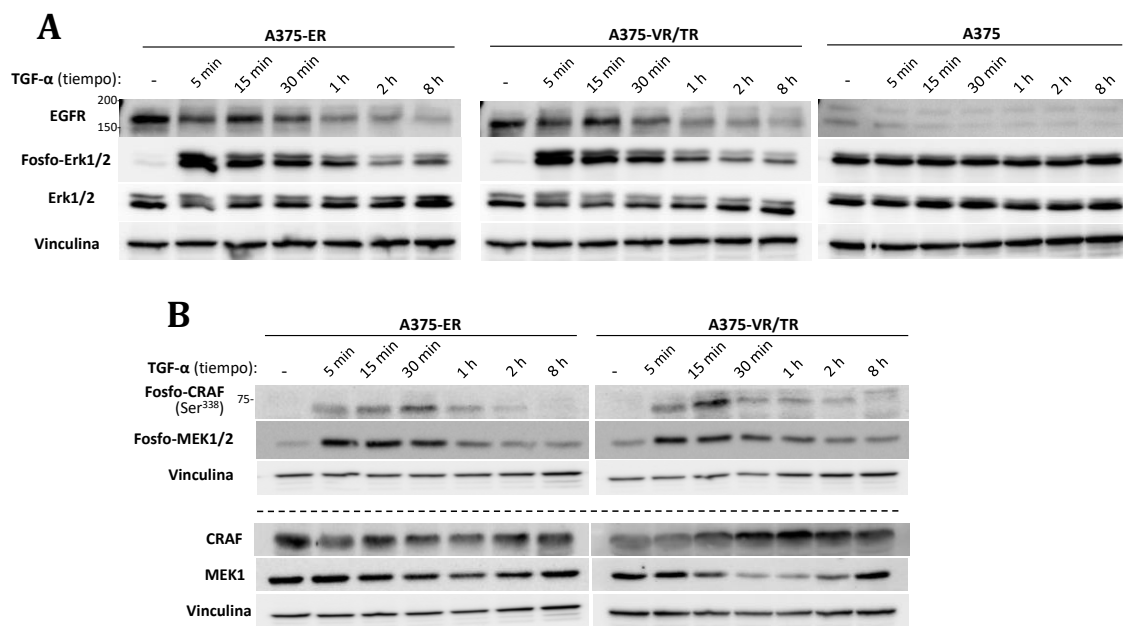


Figura 68. Cinética de la reactivación de la vía MAPK/ERK por TGF-α en células resistentes. (A, B) Las células fueron estimuladas con TGF-α (15 ng/ml) durante los tiempos indicados y analizadas por *western blotting*.

Para estudiar posibles relaciones entre los niveles de activación de Erk1/2 y la expresión de TGF-α en las células parentales y resistentes, analizamos la expresión del mRNA de *TGFA* en ambos tipos celulares, en ausencia y en presencia de inhibición de la vía MAPK/ERK. Estos ensayos mostraron una disminución significativa de *TGFA* en las células A375-ER, A375-VR/TR, SK-Mel 28-ER y SK-Mel 28-VR/TR en comparación con sus células parentales correspondientes, sugiriendo que la menor cantidad de TGF-α secretado al medio por estas células resistentes podría deberse a la disminución de la transcripción del gen (**Figura 69A**). Además, el tratamiento con SCH o con vemurafenib y trametinib a concentraciones menores que las utilizadas en las células resistentes para minimizar respuestas apoptóticas, causó la reducción de los niveles de *TGFA* en las células A375 y, en menor medida, en las células SK-Mel 28, con respecto a las células sin tratamiento (**Figura 69A**). Para profundizar todavía más en las mencionadas relaciones, determinamos los niveles de *TGFA* en melanocitos inmortalizados de la línea Mel-STV (Gupta *et al.*, 2005) transducidos para sobreexpresar BRAF^{V600E} de forma estable, los cuales habían sido generados previamente en el laboratorio. Así, observamos que las células Mel-STV-BRAF^{V600E} presentaban un aumento de fosfo-Erk1/2 (**Figura 69B**) asociado a mayores niveles de expresión de *TGFA*, en comparación con los transductantes control (Mel-STV-Mock; **Figura 69C**). Por tanto, un aumento en la activación de la vía MAPK/ERK se correlaciona con un incremento de la expresión de *TGFA*, sugiriendo que los distintos niveles de activación de Erk1/2 en las células parentales y resistentes podrían estar directamente relacionados con las diferencias en la expresión de TGF-α entre estas células. De esta manera, la disminución de la activación de Erk1/2 en las células resistentes se traduciría en una menor expresión de TGF-α, generándose un bucle negativo que contribuiría al mantenimiento de bajos niveles de fosfo-Erk1/2.

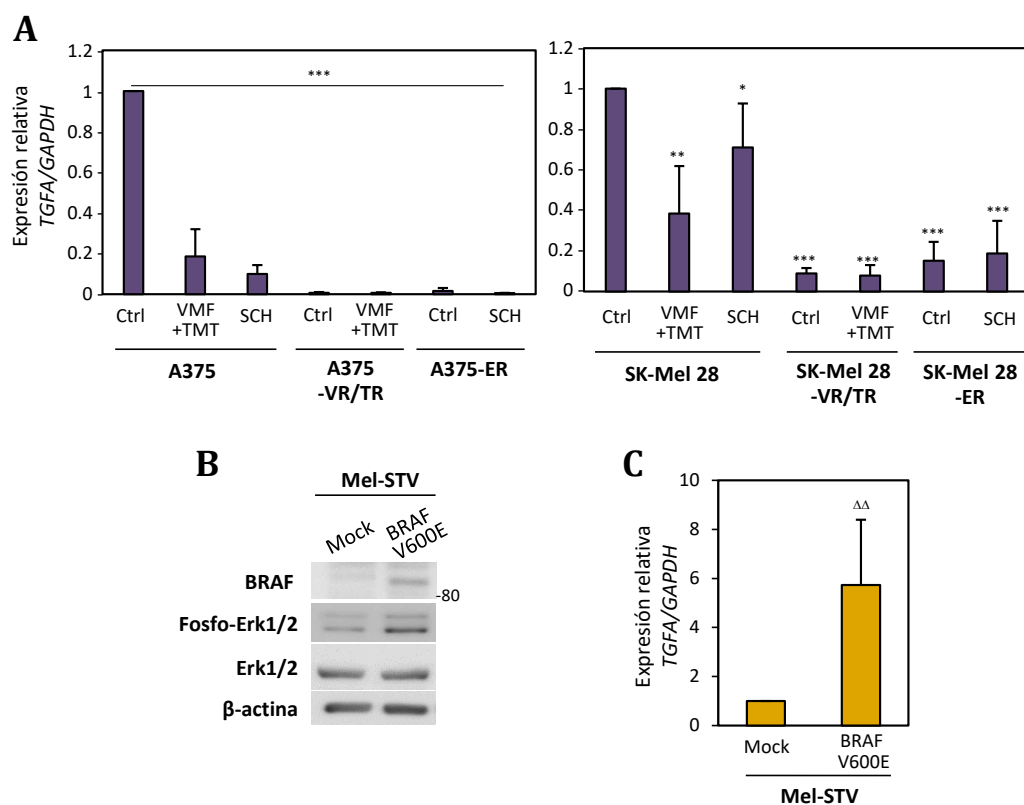


Figura 69. Análisis de la expresión de *TGFA* en células parentales, resistentes y en melanocitos Mel-STV-BRAF^{V600E}. (A) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl), en presencia de SCH (200 nM), o con la combinación de VMF (parentales, 100 nM; resistentes, 1 μ M) y TMT (parentales, 5 nM; resistentes, 50 nM), y la expresión de *TGFA* fue determinada por qPCR (n=3-4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). (B) La expresión de las proteínas indicadas en los transductantes Mel-STV fue analizada mediante *western blot*. (C) Análisis de la expresión de *TGFA* mediante qPCR en los transductantes Mel-STV (n=5; $\Delta\Delta$ p<0.01).

Correlacionando con la recuperación de la activación de la vía MAPK/ERK en respuesta a TGF- α en las células resistentes, el tratamiento con este factor de crecimiento dio lugar a un moderado pero significativo aumento de la proliferación de estas células con respecto a las células parentales (**Figura 70A**), así como a mayor resistencia a SCH en comparación con las células incubadas en ausencia de TGF- α (**Figura 70B**).

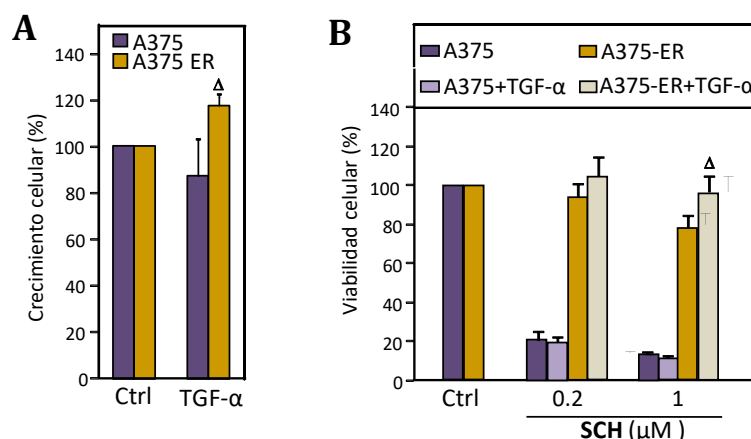


Figura 70. Proliferación y resistencia a SCH de las células A375-ER en presencia de TGF- α . Las células fueron incubadas con TGF- α (15 ng/ml) (A) o con SCH en ausencia o en presencia de TGF- α (15 ng/ml) (B), y tras 48 horas, la viabilidad celular fue determinada en ensayos de MTT. Durante las 48 horas de incubación, se añadió nuevo TGF- α tras 24 horas. Se muestran los datos referidos a las células en ausencia de TGF- α y SCH (Ctrl, 100%; n=3). Se indica el incremento ($\Delta p < 0.05$) de viabilidad con respecto a las células en ausencia de TGF- α (A) o con respecto a las células en presencia de SCH (B).

2.17. Sobreexpresión de IGFBP5 en células de melanoma resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK

El análisis de los factores de crecimiento presentes en el sobrenadante de las células A375-ER no reveló cambios significativos en los niveles de IGF-1 e IGF-2, ligandos de IGF-1R, con respecto a las células A375 (ver **Figura 63**). La señalización procedente de IGF-1R se encuentra regulada por proteínas de la familia IGFBP (IGFBP1-6), las cuales interaccionan con elevada afinidad con IGF-1 e IGF-2, pudiendo inhibir su unión al receptor (Baxter, 2014). Además de su papel como supresores tumorales, las IGFBPs pueden promover el crecimiento celular de forma dependiente o independiente de la señalización de IGF-1R, y su sobreexpresión ha sido descrita en varios tipos de cáncer (Baxter, 2014). Los resultados de los *arrays* mostrados en la **Figura 63** indicaron que no existían diferencias remarcables en los niveles de expresión de IGFBP1-4 ni de IGFBP6 en las células resistentes a SCH relativo a las células parentales. Dado que dichos *arrays* no contenían el anticuerpo para la detección de IGFBP5, y que habíamos observado previamente un aumento en la expresión del mRNA de *IGFBP5* en células A375 resistentes a vemurafenib (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017), analizamos su expresión por *western blotting* tanto en lisados como en el sobrenadante de las células parentales y resistentes. Las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH, vemurafenib/trametinib y vemurafenib/SCH mostraron mayor expresión de IGFBP5 que las células parentales (**Figura 71A**). Este aumento de IGFBP5 se correlacionó con un notable incremento de la expresión del mRNA de *IGFBP5* en las células A375-ER, A375-VR/TR y A375-VR/ER, así como en las células SK-Mel 28-ER, comparado con las correspondientes células parentales, tanto en presencia como en ausencia de los inhibidores de la vía MAPK/ERK (**Figura 71B**).

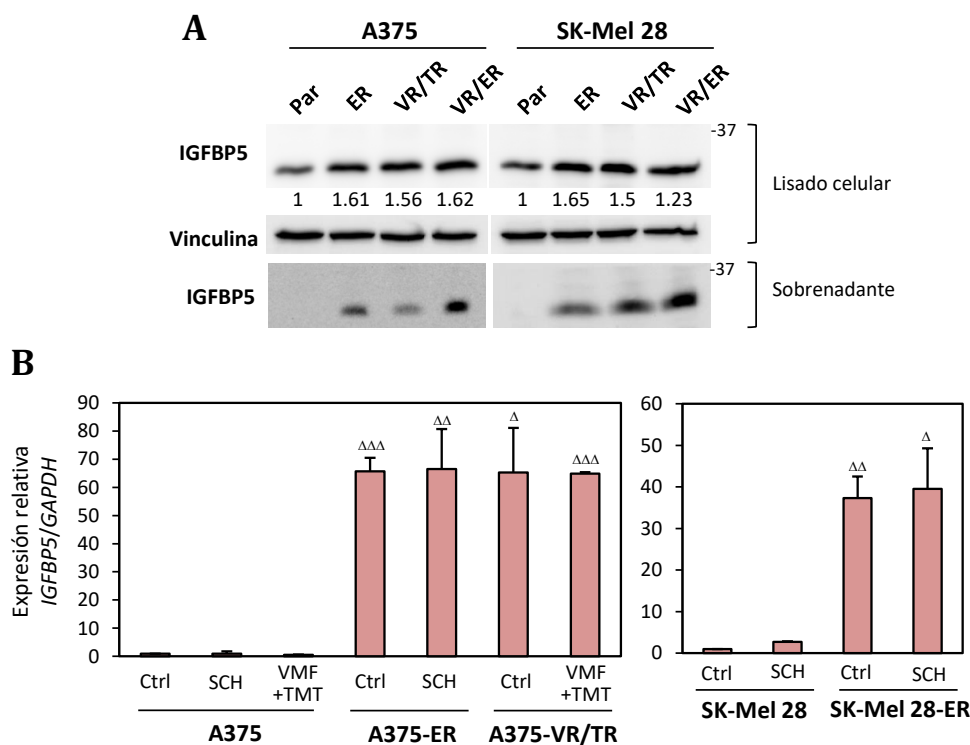


Figura 71. Expresión de IGFBP5 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK. (A) Análisis de la expresión de IGFBP5 en el lisado y en el concentrado del sobrenadante de células parentales y resistentes. Los valores representan la cuantificación densitométrica de IGFBP5 en los lisados celulares (n=2-3). (B) Las células fueron tratadas durante 48 horas con SCH (200 nM), o con VMF (parentales, 100 nM; resistentes 1 μ M) en combinación con TMT (parentales, 5 nM; resistentes, 50 nM), y la expresión de *IGFBP5* fue analizada por qPCR. Los datos están referenciados a las células parentales sin tratamiento (Ctrl; n=2-3; $\Delta p < 0.05$; $\Delta\Delta p < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$).

Para determinar la posible implicación de IGFBP5 en la regulación de la activación de IGF-1R en las células resistentes, silenciemos IGFBP5 transitoriamente mediante RNA de interferencia. Los resultados indicaron que una disminución de aproximadamente un 30% de la expresión de IGFBP5 causa una reducción moderada, pero significativa, de la fosforilación de IGF-1R en las células A375-ER y A375-VR/TR comparado con los transfectantes control (**Figura 72A, B**). Estos datos sugieren la implicación de IGFBP5 en la activación de IGF-1R en las células resistentes.

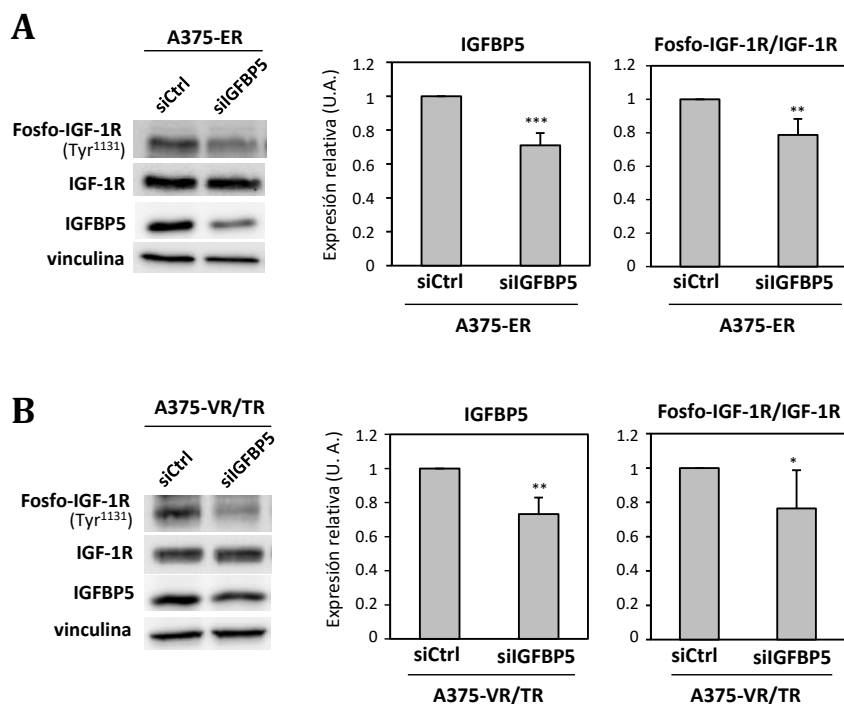


Figura 72. Efecto del silenciamiento de IGFBP5 en la fosforilación de IGF-1R. Las células A375-ER (A) y A375-VR/TR (B) fueron transfectadas con siRNA control (siCtrl) o siRNA para IGFBP5 (siIGFBP5), y tras 48 horas, la fosforilación de IGF-1R y la expresión de IGFBP5 en el lisado celular fueron determinadas por *western blotting*. Se muestra la media y la desviación estándar de la cuantificación densitométrica de las bandas de los geles (n=4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

A continuación, y con el objetivo de analizar si el aumento de la expresión de IGFBP5 podría ocurrir en etapas iniciales de la resistencia a los inhibidores de la vía MAPK/ERK, analizamos la expresión de *IGFBP5* en tumores de ratones tratados con vemurafenib y trametinib. Para ello, inoculamos subcutáneamente las células A375 parentales en ratones NSG, y posteriormente, éstos recibieron el mencionado tratamiento durante 14 días. Como era de esperar, la combinación de vemurafenib y trametinib inhibió el crecimiento tumoral (**Figura 73A**). Notablemente, los ensayos de PCR cuantitativa revelaron un aumento de la expresión de *IGFBP5* en los tumores de ratones tratados con vemurafenib y trametinib, con respecto a los tumores de los ratones que habían recibido el vehículo (**Figura 73B**). Estos resultados sugieren que el incremento de la expresión de IGFBP5 podría ocurrir en etapas tempranas durante la adquisición de resistencia a los inhibidores de BRAF y MEK.

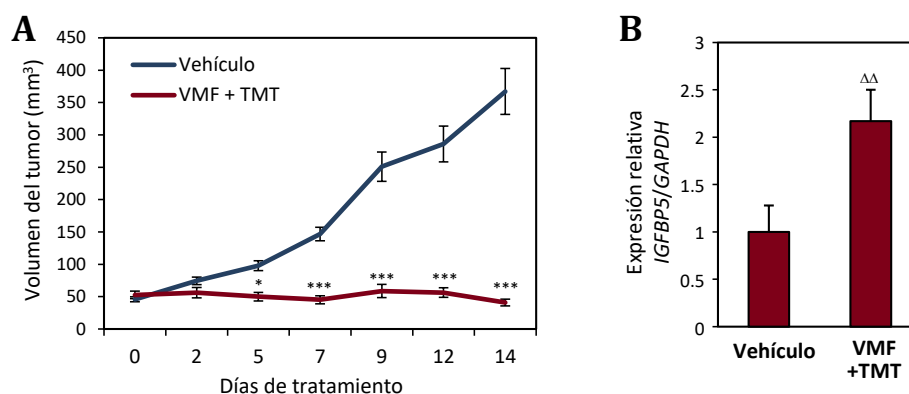


Figura 73. Análisis de la expresión de *IGFBP5* en tumores procedentes de ratones tratados con vemurafenib y trametinib. (A) Inhibición del crecimiento tumoral de células A375 en ratones NSG tratados con VMF (25 mg/kg) y TMT (0.5 mg/kg), con respecto al tratamiento con vehículo (n=11; *p<0.05; ***p<0.001). (B) Los tumores mostrados en (A) fueron extraídos tras finalizar el tratamiento, y la expresión de *IGFBP5* fue analizada por qPCR (n=11; ^{ΔΔ}p<0.01).

2.18. Caracterización molecular de células de melanoma resistentes a SCH con mutación en N-Ras

Para investigar si el *background* genético de células de melanoma podría influir en la diferente activación de Erk1/2 y Erk5 tras adquirir resistencia a SCH, analizamos células resistentes a este inhibidor generadas a partir de la línea celular SK-Mel 103, la cual es *BRAF wild type* y presenta la mutación N-Ras Q61R, y a las que denominamos SK-Mel 103-ER (ver **Figura 16**). A diferencia de las células resistentes derivadas de las líneas celulares con la mutación *BRAF*^{V600E} (A375 y SK-Mel 28), las células SK-Mel 103-ER mostraron un nivel basal de fosfo-Erk1/2 similar al de las células parentales SK-Mel 103, el cual se mantuvo en las células resistentes expuestas a concentraciones de SCH de 100 nM y 1 μ M (**Figura 74**). Adicionalmente, las células SK-Mel 103-ER presentaron mayor activación de MEK1/2 que las células parentales, siendo esta diferencia más notable tras el tratamiento con SCH (**Figura 74**). Análisis de la secuenciación de las células resistentes indicaron que la activación de Erk1/2 en presencia de SCH no era debida a la adquisición de mutaciones en Erk1 G186, Erk2 G169 ni en Erk2 Q105 (no mostrado).

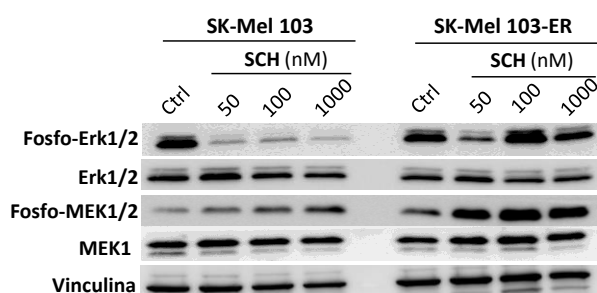


Figura 74. Análisis de la activación de Erk1/2 y MEK1/2 en células SK-Mel 103 resistentes a SCH. Las células fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de SCH y analizadas por *immunoblotting*.

Asimismo, no detectamos diferencias significativas en la activación de Ras entre las células parentales y resistentes (**Figura 75A**), y contrariamente a lo observado en las células A375-ER y SK-Mel 28-ER, las células SK-Mel 103-ER mostraron niveles de fosforilación de Erk5 dependiente de MEK5 similares a las parentales (**Figura 75B**). Por

otra parte, las células resistentes presentaron niveles de fosfo-Akt superiores a los de las parentales en presencia de alta concentración de SCH (1 μ M), aunque la activación basal de Akt en ausencia del inhibidor era similar en ambos tipos celulares (**Figura 75C**).

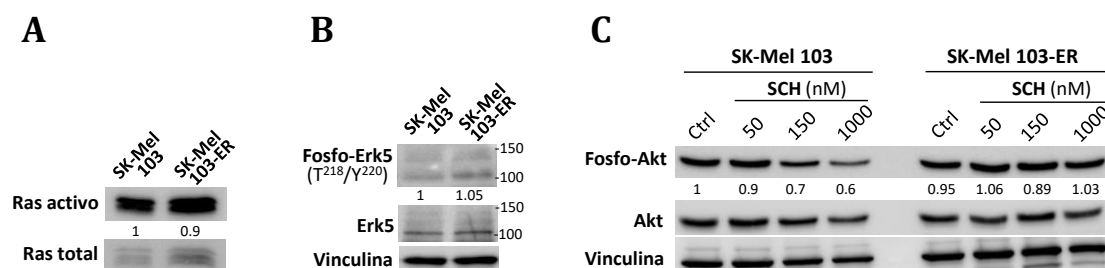


Figura 75. Análisis de la activación de Ras, Erk5 y Akt en células SK-Mel 103-ER. (A) Ensayo de actividad GTPasa para detectar la activación de Ras (n=3). (B, C) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de las concentraciones indicadas de SCH, para posteriormente ser analizadas por *western blotting*. Los valores situados debajo de los geles indican la cuantificación densitométrica de las bandas.

Los análisis de expresión de proteínas de ciclo celular revelaron niveles similares de expresión de Cdk4, Cdk6 y Cdk2 entre las células SK-Mel 103-ER y las células parentales, mientras que se observó una moderada disminución de los niveles de ciclina D1 en las células resistentes con respecto a las células SK-Mel 103 (**Figura 76**).

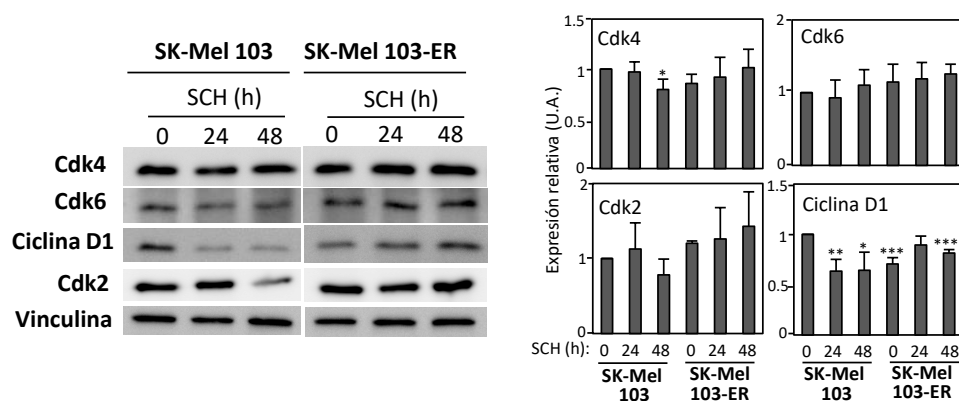


Figura 76. Análisis de la expresión de Cdk4, Cdk6, Cdk2 y ciclina D1 en células SK-Mel 103 parentales y resistentes. (Izquierda) Las células fueron incubadas en ausencia o en presencia de SCH (200 nM), y la expresión de las proteínas indicadas fue analizada por *western blotting*. (Derecha) Se muestra la media y la desviación estándar de las cuantificaciones densitométricas de las bandas (n=2-4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Colectivamente, estos resultados muestran diferencias importantes en la activación de componentes de las vías MAPK/ERK y MEK5-Erk5, así como en la expresión de Cdk2, Cdk4 y Cdk6, entre las células resistentes a SCH con mutación en N-Ras y las células que expresan la mutación BRAF^{V600E}.

3. Análisis de la regulación de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib e identificación de sus dianas proteicas

3.1. Implicación de miR-204-5p y miR-211-5p en resistencia a vemurafenib *in vivo*

La resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en melanoma puede estar asimismo asociada a alteraciones no genómicas que impliquen cambios en la expresión de miRNAs (Hugo *et al.*, 2015; Fattore *et al.*, 2017). En la Tesis Doctoral de Marta Díaz Martínez (2017), se investigaron posibles diferencias en los perfiles de expresión de miRNAs en células de melanoma resistentes a vemurafenib con respecto a células parentales. Para ello, se secuenciaron los RNAs de pequeño tamaño mediante RNAseq en células A375 y A375-VR. La validación por qPCR indicó un incremento significativo de la expresión de miR-204-5p y miR-211-5p, así como una disminución de los niveles de miR-140-3p, en las células A375-VR en comparación con las células A375. Para estudiar la posible implicación de estos miRNAs en la resistencia a vemurafenib, se generaron mediante infección lentiviral células A375 con sobreexpresión de miR-204-5p (H-miR-204) o miR-211-5p (H-miR-211), o con expresión disminuida de miR-140-3p (Zip-miR-140). Asimismo, se obtuvieron triple transductantes en células A375 que presentaban la expresión alterada de estos tres miRNAs (Triple-miR). Ensayos de proliferación y viabilidad en presencia de vemurafenib revelaron que los transductantes H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR tenían aumentada de forma moderada pero significativa, la resistencia a vemurafenib con respecto a los transductantes control (H-scr). Los datos de dicha Tesis indicaron que el aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células A375-VR, pero no la reducción de los niveles de miR-140-3p, les confiere ventaja de supervivencia *in vitro* frente al vemurafenib.

En la presente Tesis Doctoral, y con el objetivo de determinar si el incremento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p junto con el silenciamiento de miR-140-3p favorece la resistencia a vemurafenib *in vivo*, los transductantes Triple-miR y los correspondientes transductantes control fueron inoculados subcutáneamente en ratones NSG, los cuales fueron posteriormente tratados con vemurafenib. El tratamiento con vemurafenib disminuyó el crecimiento de los tumores de las células control, mientras que las células Triple-miR mostraron un aumento significativo del crecimiento en presencia de vemurafenib con respecto a las células control (**Figura 77**). Este resultado obtenido en condiciones *in vivo* confirmó la implicación de dichos miRNAs en la resistencia a vemurafenib. Dado que los resultados de los experimentos *in vitro* no mostraban un papel relevante de miR-140-3p en la resistencia a vemurafenib (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017), es altamente probable que la resistencia observada *in vivo* de las células Triple-miR sea debida al aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p.

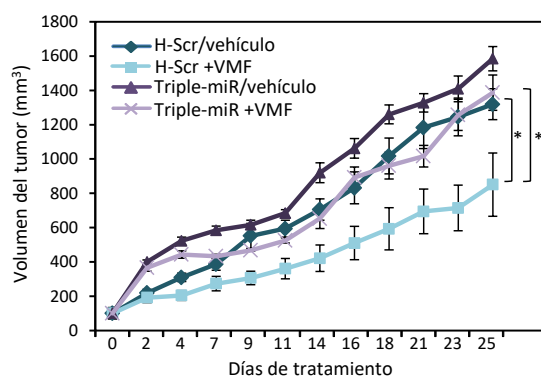


Figura 77. Análisis *in vivo* de la resistencia a vemurafenib de las células A375 Triple-miR.

Los ratones NSG fueron inoculados subcutáneamente con transductantes control (H-Scr) o con transductantes con sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p, y silenciamiento de miR-140-3p (Triple-miR). Los ratones fueron posteriormente tratados con vehículo o VMF (25 mg/kg). Las barras de error representan el SEM (n=5 por condición; *p<0.05).

3.2. Análisis de mecanismos implicados en el aumento de expresión de miR-204-5p y miR-211-5p en células A375-VR

La secuencia codificante para miR-204 está localizada en el intrón 6 del gen *TRPM3* (*Transient Receptor Potential Melastatin 3*), por lo que se ha propuesto la existencia de mecanismos comunes que regulan de la expresión de miR-204 y *TRPM3* (Couboulin *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2014). Coincidiendo con el aumento de expresión de miR-204-5p, las células A375-VR mostraron mayores niveles de expresión de *TRPM3* en comparación con las células parentales (**Figura 78A**). Puesto que se ha descrito que el factor de transcripción PAX6 promueve la expresión de *TRPM3* y miR-204 (Shaham *et al.*, 2013), examinamos la posible implicación de esta proteína en la regulación de miR-204-5p en las células A375-VR. Las células A375-VR, tanto en ausencia como en presencia de vemurafenib, así como las células parentales tratadas con vemurafenib, mostraron un notable incremento de los niveles de PAX6 con respecto a las células parentales en ausencia del inhibidor (**Figura 78B**). No obstante, el silenciamiento de la expresión de PAX6 en las células A375-VR mediante RNA de interferencia no alteró la expresión de miR-204-5p (**Figura 78C**).

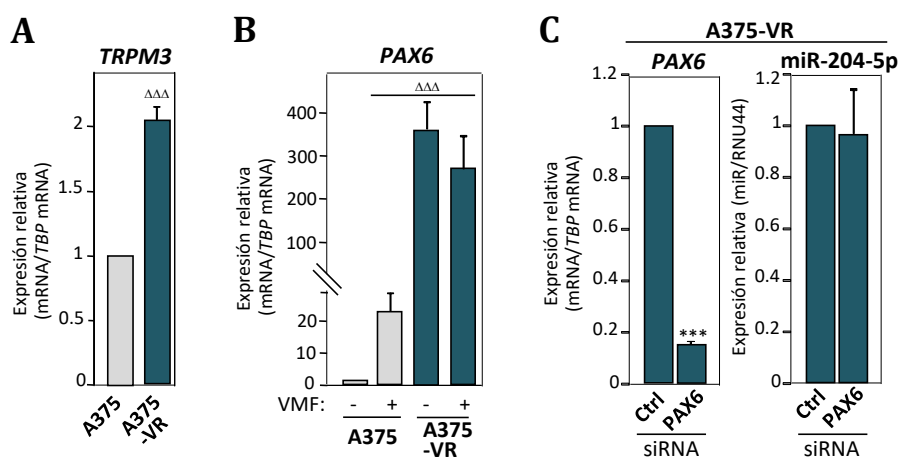


Figura 78. Análisis de la expresión de *TRPM3*, *PAX6* y del posible papel de *PAX6* en la regulación de la expresión de miR-204-5p en células A375-VR. (A, B) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (A, B) o en presencia de VMF (1.3 μ M; B), y la expresión de los mRNAs indicados analizada mediante qPCR (n=3; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001). (C) Las células A375-VR fueron transfectadas con siRNA para PAX6 o siRNA control (Ctrl), y tras 48 horas, la expresión de PAX6 y de miR-204-5p fue determinada por qPCR (n=3; ***p<0.001).

La implicación de STAT3 en la regulación de la expresión de miR-204-5p en melanoma ha sido descrita recientemente (Vitiello *et al.*, 2017). Por ello, silenciamos *STAT3* en las células A375-VR, y observamos que una reducción del 30-35% de los niveles de *STAT3* causa una disminución significativa de la expresión de miR-204-5p (**Figura 79**). Estos resultados indican que *STAT3* está involucrado en el aumento de expresión de miR-204-5p en las células resistentes a vemurafenib.

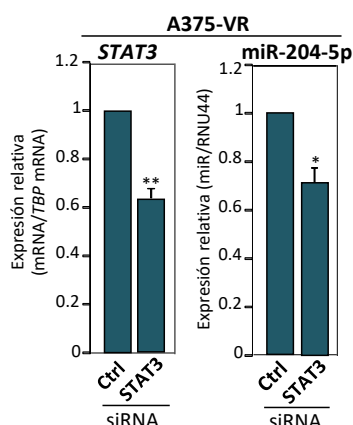


Figura 79. Análisis del papel de STAT3 en la regulación de la expresión de miR-204-5p en células A375-VR. Las células A375-VR fueron transfectadas con siRNA para *STAT3* o siRNA control (Ctrl), y tras 48 horas, la expresión de *STAT3* y de miR-204-5p fue analizada mediante qPCR (n=3; *p<0.05; **p<0.01).

Por su parte, el gen que codifica para miR-211 se localiza en el intrón 6 del gen *TRPM1* (también conocido como melastatina-1) (Levy *et al.*, 2010), y previamente habíamos observado que el incremento de la expresión de miR-211-5p se correlacionaba con un aumento de los niveles de *TRPM1* en las células A375-VR (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017). Dado que el factor de transcripción MITF regula la transcripción de *TRPM1* y miR-211 en melanoma (Miller *et al.*, 2004; Vitiello *et al.*, 2017), analizamos el potencial papel de MITF en la regulación de la expresión de miR-211-5p en las células A375-VR. Los niveles de expresión de MITF resultaron ser similares en células parentales y resistentes (**Figura 80A**). No obstante, la expresión de tirosinasa (*TYR*), la cual constituye un marcador de la actividad transcripcional de MITF (Yasumoto *et al.*, 1994), se mostró incrementada tanto en las células resistentes como en las células parentales tratadas con vemurafenib, en comparación con las células parentales en ausencia de vemurafenib (**Figura 80B**). Estos datos sugerían la posibilidad de que el incremento de actividad de MITF fuera responsable de la inducción de miR-211 en las células resistentes. Sin embargo, el silenciamiento de MITF en las células A375-VR no causó cambios significativos en la expresión de miR-211-5p (**Figura 80C**), indicando que el aumento de miR-211-5p en estas células es independiente de MITF.

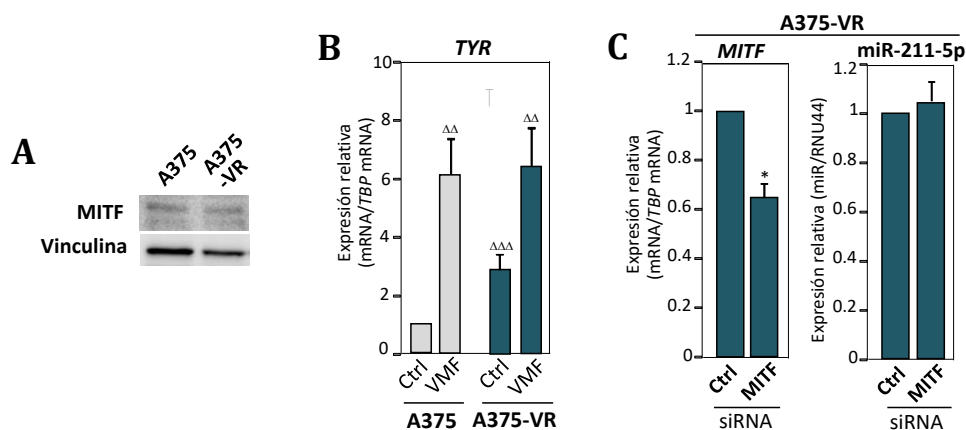


Figura 80. Análisis del potencial papel de MITF en la regulación de la expresión de miR-211-5p en células A375-VR. (A) Análisis mediante *immunoblotting* de la expresión de MITF. (B) Las células fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (Ctrl) o en presencia de VMF (1.3 μ M), y posteriormente analizadas por qPCR ($n=3$; $^{\Delta\Delta}p<0.01$; $^{\Delta\Delta\Delta}p<0.001$). (C) Las células A375-VR fueron transfectadas con siRNA para MITF o siRNA control (Ctrl), y tras 48 horas, la expresión de *MITF* y de miR-211-5p fue determinada mediante qPCR ($n=3$; $*p<0.05$).

3.3. Análisis de la expresión de proteínas diana de miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib

Los miRNAs miR-204-5p y miR-211-5p presentan varias dianas comunes, ya que sus secuencias nucleotídicas son similares y comparten la misma secuencia “semilla”. En la Tesis Doctoral de Marta Díaz Martínez, la expresión de mRNA de varias dianas de miR-204-5p y/o miR-211-5p fue determinada mediante qPCR en los transductantes de células A375 que sobreexpresaban dichos miRNAs, así como en las células A375-VR. El análisis de la expresión proteica de las dianas de los miRNAs es asimismo importante para determinar la posible relevancia funcional de las alteraciones en los niveles de mRNAs diana observadas en las células resistentes a vemurafenib y en los mencionados transductantes. Por tanto, en la presente Tesis determinamos la expresión mediante *western blot* de dos dianas comunes de miR-204-5p y miR-211-5p (NUAK1/ARK5 e IGFBP5), de una diana de miR-204-5p (efrina-B2), y de una diana de miR-211-5p (CHOP/GADD153).

Los resultados previos habían mostrado una disminución de la expresión de *NUAK1* en las células A375-VR con respecto a las parentales, así como en los transductantes H-miR-204, H-miR-211 y Triple-miR en comparación con las células control (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017; **Figura 81A**). Esta reducción de los niveles de *NUAK1* se correlacionó con una disminución significativa de la expresión proteica de *NUAK1* en las células A375-VR, y en los transductantes H-miR-211 y Triple-miR, pero no en las células H-miR-204 (**Figura 81B**). Por otra parte, las células con sobreexpresión de miR-204-5p y/o miR-211-5p mostraron una reducción de los niveles de *IGFBP5*, lo que confirmaría que constituye una diana para dichos miRNAs, aunque, por contra, las células A375-VR presentaron un incremento significativo de *IGFBP5* (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017; **Figura 81A**). El incremento de expresión de *IGFBP5* fue confirmado por *immunoblotting* en las células A375-VR (**Figura 81C**), sugiriendo que

la expresión de IGFBP5 no estaría regulada por miR-204-5p ni miR-211-5p en estas células. Notablemente, el incremento de IGFBP5 en las células A375-VR coincide con la mayor expresión de IGFBP5 observada en las células A375-ER, A375-VR/TR y A375-VR/ER, así como en las células SK-Mel 28 resistentes (ver **Figura 71**).

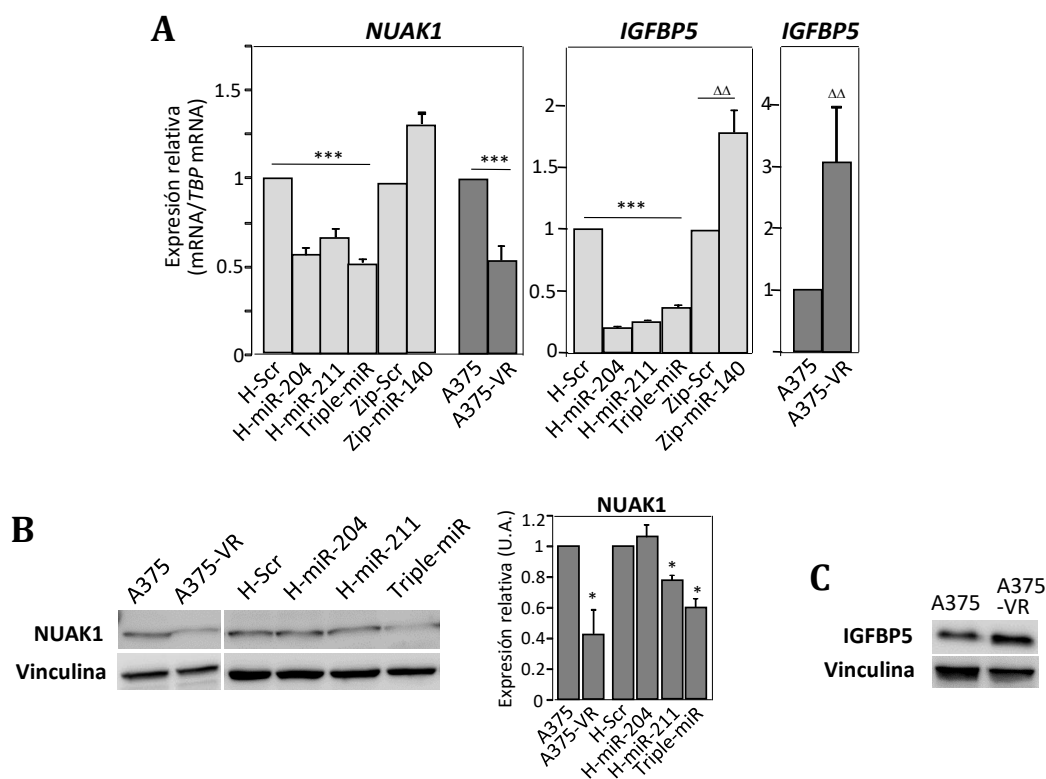


Figura 81. Análisis de la expresión de NUAK1 e IGFBP5 en células A375-VR y en transductantes que sobreexpresan miR-204-5p y miR-211-5p. (A) Expresión del mRNA de los genes indicados (figura obtenida de la Tesis Doctoral de Marta Díaz Martínez, 2017). Se indica la disminución (** $p < 0.001$) o el incremento ($\Delta\Delta p < 0.01$) de expresión ($n = 3-5$). (B, C) Expresión de las proteínas indicadas determinada por *western blot*. Se muestra la media de la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a NUAK1 ($n = 4$; * $p < 0.05$).

Por otra parte, la expresión de *EFNB2*, codificante para efrina-B2 y diana de miR-204-5p, disminuyó tanto en los transductantes H-miR-204 y Triple-miR, como en las células A375-VR (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017; **Figura 82A**). No obstante, el análisis de la expresión proteica de efrina-B2 no mostró diferencias significativas entre los transductantes que sobreexpresaban miR-204-5p y los transductantes control, ni entre células A375-VR y A375 (**Figura 82B**).

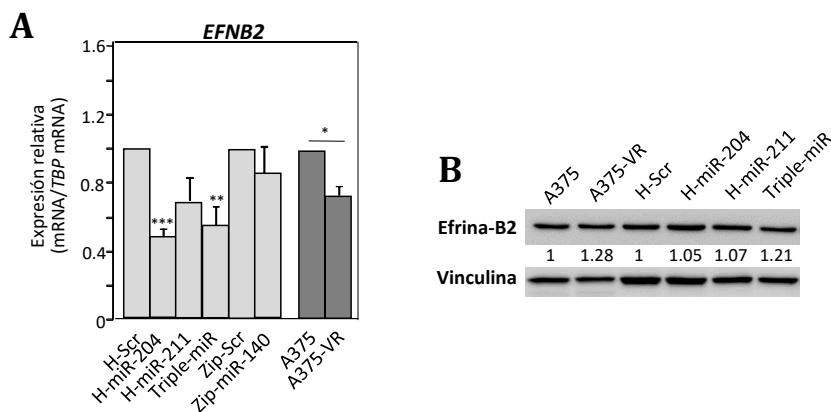


Figura 82. Análisis de la expresión de efrina-B2 en células A375-VR y en transductantes con sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p. (A) Expresión del mRNA de *EFNB2* (n=3-5; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001) (figura obtenida de la Tesis Doctoral de Marta Díaz Martínez, 2017). (B) Expresión de efrina-B2 determinada por *western blot*. Se muestra la cuantificación densitométrica de las bandas (n=3).

Finalmente, analizamos la expresión del factor de transcripción pro-apoptótico CHOP, diana de miR-211-5p, en las células parentales y resistentes a vemurafenib. Anteriormente, habíamos observado la disminución del mRNA de *CHOP* en los transductantes H-miR-211 y en las células A375-VR (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017; **Figura 83A**). Para poder visualizar CHOP de forma eficiente, las células A375 y A375-VR fueron incubadas con taspigargina (Thg), un compuesto que induce estrés de retículo endoplásmico. Siguiendo este protocolo, observamos una reducción de la expresión de CHOP en las células A375-VR en comparación con las células parentales en presencia de taspigargina (**Figura 83B**), sugiriendo que CHOP podría estar regulado por miR-211-5p en las células A375-VR.

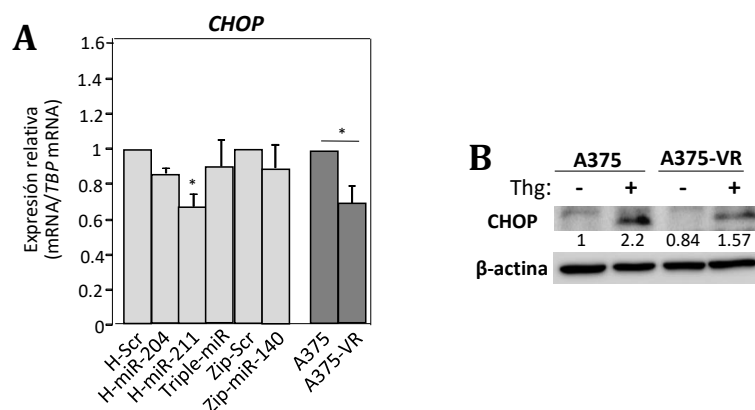


Figura 83. Análisis de la expresión de CHOP en células A375-VR y en células con sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p. (A) Expresión del mRNA de *CHOP* (n=3-5; *p<0.05) (figura obtenida de la Tesis Doctoral de Marta Díaz Martínez, 2017). (B) Las células fueron incubadas durante 16 horas en ausencia o en presencia de taspigargina (Thg; 500 nM), y posteriormente analizadas por *western blot*. Se muestra la cuantificación densitométrica de las bandas (n=2).

DISCUSIÓN

1. Generación y caracterización de líneas celulares de melanoma con resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK

La adquisición de resistencia a los inhibidores de BRAF y/o MEK constituye un importante problema en el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico con la mutación BRAF^{V600E}. Por ello, comprender los mecanismos implicados en la pérdida de respuesta a estas terapias es fundamental para el diseño de nuevos tratamientos que mejoren la calidad de vida y permitan prolongar la supervivencia de los pacientes. La reactivación de Erk1/2 en pacientes resistentes al tratamiento con inhibidores de BRAF y/o MEK es una respuesta frecuente (Long, Fung *et al.*, 2014; Moriceau *et al.*, 2015). Además, la pérdida del *feedback* negativo dependiente de Erk1/2 en células con mutación en RAS tratadas con inhibidores de MEK se traduce en la recuperación parcial de la activación de la vía MAPK/ERK, asociada a una escasa eficacia del tratamiento (Hatzivassiliou *et al.*, 2013; Lito *et al.*, 2014; Caunt *et al.*, 2015). De esta manera, se ha propuesto la inhibición directa de ERK como estrategia terapéutica para conseguir una mayor supresión de la vía MAPK/ERK y prolongar así las respuestas a los tratamientos, tanto en tumores que expresan BRAF^{V600E} como en tumores con mutación en RAS (Morris *et al.*, 2013; Germann *et al.*, 2017; Moschos *et al.*, 2018; Sullivan *et al.*, 2018). Sin embargo, la experiencia con las terapias basadas en la inhibición de BRAF y/o MEK sugiere que es previsible que los pacientes tratados con inhibidores de ERK también adquieran resistencia. Por ello, en esta Tesis se ha llevado a cabo el estudio de mecanismos implicados en la resistencia de células de melanoma a un inhibidor de Erk1/2 (SCH772984). A partir de las líneas celulares de melanoma humano A375 y SK-Mel 28, las cuales expresan la mutación BRAF^{V600E}, obtuvimos células resistentes a SCH (A375-ER, SK-Mel 28-ER). Asimismo, generamos células resistentes a las combinaciones de vemurafenib y trametinib (A375-VR/TR, SK-Mel 28-VR/TR) o vemurafenib y SCH (A375-VR/ER, SK-Mel 28-VR/ER). Como modelo de melanoma con mutación N-Ras^{Q61R}, utilizamos la línea celular SK-Mel 103, a partir de la cual obtuvimos las células SK-Mel 103-ER resistentes a SCH.

Además de crecer en presencia de SCH, las células A375-ER, SK-Mel 28-ER y SK-Mel 103-ER mostraron asimismo resistencia a otro inhibidor de Erk2 (Vx-11e), cuyo mecanismo de acción difiere del de SCH (Aronov *et al.*, 2009), indicando que la resistencia de estas células no es exclusiva de SCH. Las células A375-ER y SK-Mel 28-ER no presentaron sensibilidad a vemurafenib o trametinib, ni a las combinaciones de éstos con SCH. Estos resultados sugieren que la resistencia a inhibidores de ERK, en el caso de que ésta fuera la terapia de primera línea, no permitiría el posterior uso de inhibidores de BRAF y/o MEK como tratamiento de segunda línea. Por su parte, observamos que las células A375-VR/TR también muestran resistencia a SCH y a la triple combinación de vemurafenib, trametinib y SCH. Este resultado contrasta con otros estudios, en los cuales se observó que la inhibición de ERK por SCH era efectiva en células con resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK (Morris *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014). Esta distinta respuesta a SCH se debe probablemente a que nuestro modelo de resistencia a la combinación de vemurafenib y trametinib no muestra reactivación de Erk1/2 en presencia de los inhibidores, a diferencia de las células resistentes analizadas en dichos estudios.

La resistencia a SCH de las células A375-ER no depende de la presencia continua del inhibidor, indicando que las alteraciones moleculares adquiridas por estas células y

asociadas a la resistencia son estables. Se ha descrito previamente que las células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF y/o MEK pueden presentar adicción a dichos inhibidores, de manera que el crecimiento de las células se ralentiza tras la discontinuación del tratamiento (Das Thakur *et al.*, 2013; Moriceau *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2018). No obstante, éste no parece ser el caso de las células A375-ER, ya que en ensayos de proliferación *in vitro* observamos que estas células proliferan de forma similar tanto en ausencia como en presencia de SCH. Adicionalmente, las células resistentes a SCH presentaron una tasa de proliferación y un crecimiento independiente de adhesión *in vitro* superior a la de las células parentales, lo que se correlacionó con un mayor crecimiento *in vivo* en ratones NSG de los tumores de células A375-ER que los de las células parentales. Las bases moleculares de la mayor proliferación de las células resistentes a SCH no han sido estudiadas en este trabajo.

2. Identificación de alteraciones en rutas de señalización en las células resistentes y determinación de su implicación en las resistencias

2.1. Las células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a las combinaciones de inhibidores de BRAF/MEK o de BRAF/ERK muestran una reducción de la activación de Erk1/2

Las células A375-ER y SK-Mel 28-ER mostraron una fuerte disminución de la fosforilación de Erk1/2 y RSK con respecto a las células parentales. La inhibición de la activación de Erk1/2 en las células resistentes resultó ser independiente de la presencia continua de SCH, coincidiendo con el mantenimiento de la resistencia al tratamiento. Adicionalmente, dicho inhibidor disminuyó todavía más la fosforilación residual de Erk1/2 en estas células resistentes, indicando que SCH es capaz de unirse e inhibir a su diana. Esta observación concordaría con el hecho de que nuestras células resistentes no presentan mutaciones en Erk1^{G186}, Erk2^{G169} ni Erk2^{Q105}, las cuales interfieren con la unión del inhibidor a Erk1/2 y causan resistencia a SCH en células de cáncer colorrectal con mutación en *KRAS* (Jha *et al.*, 2016; Jaiswal *et al.*, 2018), así como resistencia a Vx-11e y a SCH en células A375 (Goetz *et al.*, 2014). Además, la fosforilación de MEK se encuentra reducida en nuestras células resistentes, indicando que la resistencia a SCH se asocia a un bloqueo de la activación de la vía MAPK/ERK. Las células A375-VR/TR, A375-VR/ER, SK-Mel 28-VR/TR y SK-Mel 28-VR/ER mostraron asimismo una menor activación de la ruta MAPK/ERK en comparación con las células parentales. Estos resultados coinciden con datos recientes que muestran la disminución de la fosforilación de Erk1/2 tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares de melanoma resistentes al doble tratamiento con inhibidores de BRAF y MEK (Lu *et al.*, 2017). Por tanto, aunque la reactivación de ERK se presenta en parte de los pacientes con melanoma resistente a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK (Long, Fung *et al.*, 2014; Moriceau *et al.*, 2015), la resistencia a dicho tratamiento combinado puede estar causada en otros casos por la activación de vías alternativas a MAPK/ERK.

2.2. Implicación de la vía IGF-1R-MEK5-Erk5 en la resistencia de células de melanoma a inhibidores de ERK o a las combinaciones de inhibidores de BRAF/MEK o de BRAF/ERK

Nuestros resultados han mostrado que la disminución de la activación de Erk1/2 en las células resistentes a SCH se encuentra compensada por el aumento de la activación de la vía MEK5-Erk5, la cual permite su supervivencia en presencia de bajos niveles de fosfo-Erk1/2. Así, las células A375-ER y SK-Mel 28-ER presentaron mayores niveles de fosforilación de Erk5 dependiente de MEK5 que las células parentales. La implicación de Erk5 en la resistencia a SCH fue determinada mediante la inhibición de MEK5 con el compuesto BIX02189, la expresión de una forma dominante negativa de MEK5 y por el silenciamiento estable de Erk5. En estos ensayos, observamos que el bloqueo de la activación de la vía MEK5-Erk5 causa una disminución significativa de la viabilidad y la proliferación de las células resistentes, y además, la disminución de la expresión de Erk5 reduce el crecimiento de las células A375-ER, tanto *in vitro* como en ratones NSG. Las células con resistencia a las combinaciones de vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH presentaron asimismo un aumento de la fosforilación de Erk5 y sensibilidad a la inhibición de MEK5. Nuestros resultados muestran por primera vez la implicación de la vía MEK5-Erk5 en resistencia a inhibidores de la ruta MAPK/ERK en células de melanoma. Se ha descrito recientemente la activación de Erk5 y su participación en el crecimiento de células de melanoma que expresan BRAF^{V600E} o BRAF *wild type* (Tusa *et al.*, 2018). Adicionalmente, este estudio mostró que la inhibición de Erk5 en células de melanoma con la mutación BRAF^{V600E} incrementa la respuesta al tratamiento con vemurafenib (Tusa *et al.*, 2018). Existen múltiples evidencias de la implicación de la vía MEK5-Erk5 en la progresión tumoral mediante el incremento de la proliferación y supervivencia celular. Por ejemplo, se ha identificado la activación de MEK5-Erk5 en cáncer de mama y de próstata, en mieloma múltiple, mesotelioma y carcinoma hepatocelular, entre otros tipos de cáncer (Simões *et al.*, 2016; Pereira y Rodrigues, 2020; Tubita *et al.*, 2020). La ruta MEK5-Erk5 puede estar asimismo involucrada en resistencia a tratamiento en algunos tipos de tumores. Así, la disminución de la expresión de Erk5 incrementa la sensibilidad al trastuzumab en células de cáncer de mama con sobreexpresión de ErbB2 (Montero *et al.*, 2009), mientras que la sobreexpresión de MEK5 ha sido relacionada con resistencia a terapia hormonal (Antoon *et al.*, 2013). La activación de Erk5 también causa resistencia a la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos, como el 5-fluorouracilo y la doxorrubicina (Shukla *et al.*, 2013; Yang, Liao *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2016), ampliamente utilizados en cáncer. Asimismo, se ha mostrado en modelos de ratón que la pérdida de expresión de Erk5 en células tumorales incrementa la activación de células NK (Charni *et al.*, 2009) y el reclutamiento de linfocitos T al tumor (Loveridge *et al.*, 2017), sugiriendo que la inhibición de Erk5 podría potenciar la respuesta inmune antitumoral. Por todo ello, la inhibición de la vía MEK5-Erk5, posiblemente en combinación con otros tratamientos, constituye una potencial terapia en melanoma y otros tipos de cáncer.

Erk5 activo regula la expresión de genes implicados en proliferación celular mediante la fosforilación de varios factores de transcripción, o bien de forma independiente de su actividad quinasa a través de su interacción con dichos factores (Tubita *et al.*, 2020). Las células A375-ER mostraron un aumento de la expresión de *c-MYC*, dependiente en parte de la fosforilación de Erk5, con respecto a las células A375. De forma

similar, se ha descrito que la activación de Erk5 en neuroblastoma se traduce en un aumento de la expresión de *n-MYC*, perteneciente a la familia de factores de transcripción Myc (Umapathy *et al.*, 2014). La expresión de *c-JUN* es inducida tras la fosforilación del factor de transcripción MEF2C por Erk5 (Kato, 1997), y de acuerdo con esto, observamos un aumento de los niveles de *c-JUN* en las células A375-ER. Por otra parte, Erk5 promueve la transición G₁-S del ciclo celular mediante la expresión de *CCND1* (Mulloy *et al.*, 2003), por lo que Erk5 podría contribuir al mantenimiento de la expresión de ciclina D1 que hemos detectado en las células A375-ER en presencia de SCH. Además, Erk5 disminuye la expresión del inhibidor de ciclo celular p21 (Yang, Deng *et al.*, 2010), cuyos niveles de mRNA (*CDKN1A*) están reducidos en las células A375-ER. Se ha observado que la disminución de los niveles de p21 causada por la actividad de Erk5 ocurre tras la fosforilación e inhibición de la proteína PML, la cual actúa como supresor tumoral induciendo la expresión de p21 (Yang, Deng *et al.*, 2010). Asimismo, en células de cáncer de mama con altos niveles de Erk5 activo, se ha descrito la disminución de p21 mediante la activación de la expresión del *cluster* miR-17-92 por c-Myc (Perez-Madrigal *et al.*, 2012), por lo que podrían existir conexiones entre la regulación de *c-MYC* y *CDKN1A* por Erk5 en las células A375-ER.

La vía MEK5-Erk5 puede ser activada en respuesta a varios factores de crecimiento, incluyendo EGF (Kato *et al.*, 1998), VEGF (Roberts *et al.*, 2010), PDGF (Rovida *et al.*, 2008) y HGF (Ramos-Nino *et al.*, 2008; Castro y Lange, 2010; Shioyama *et al.*, 2011). Además, se ha descrito la activación de Erk5 en células de cáncer de mama con sobreexpresión de ErbB2 (Esparis-Ogando *et al.*, 2002), así como en células de neuroblastoma con sobreexpresión o activación constitutiva de ALK (Umapathy *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que el aumento de la fosforilación de Erk5 en las células resistentes a SCH y a las combinaciones de vemurafenib/trametinib y vemurafenib/SCH es consecuencia del incremento de la activación de IGF-1R. Así, las células resistentes presentan mayores niveles de expresión y fosforilación de IGF-1R que las células parentales, y el tratamiento con un inhibidor de IGF-1R (linsitinib) inhibe tanto su fosforilación como la de Erk5 en las células resistentes. Los ensayos con cicloheximida han revelado que uno de los mecanismos involucrados en el aumento de expresión de IGF-1R es la estabilidad de esta proteína en las células resistentes. Notablemente, el bloqueo de IGF-1R con linsitinib inhibe el crecimiento 3D de esferoides de células A375-ER, A375-VR/TR y A375-VR/ER, y reduce la proliferación de células A375-ER inoculadas subcutáneamente en ratones NSG. Por tanto, la activación de la vía IGF-1R-MEK5-Erk5 es clave en la resistencia a SCH, así como a las combinaciones de vemurafenib/trametinib y vemurafenib/SCH.

El aumento de expresión y activación de RTKs constituye un mecanismo de resistencia a inhibidores de BRAF previamente descrito (Nazarian *et al.*, 2010), habiéndose demostrado la resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK mediada por IGF-1R (Villanueva *et al.*, 2010; Wang, Sinnberg *et al.*, 2015; Strub *et al.*, 2018). No obstante, la activación de Erk5 dependiente de IGF-1R en melanoma no había sido descrita hasta el momento, siendo por tanto un resultado novedoso. Globalmente, nuestros datos revelan que IGF-1R causa resistencia a la inhibición de la vía MAPK/ERK en células de melanoma, mediante la activación de la vía MEK5/Erk5. Las células A375-ER mostraron asimismo un importante aumento de los niveles de ErbB2 fosforilado en tirosinas, aunque el

tratamiento con trastuzumab o lapatinib no afectó a la viabilidad de las células A375-ER, sugiriendo que ErbB2 no jugaría un papel relevante en la resistencia a SCH.

Las células resistentes a SCH presentaron mayor activación de Ras que las células parentales. La pérdida de mecanismos *feedback* reguladores negativos de la activación de Ras-MAPK dependientes de Erk1/2 (Lito *et al.*, 2012) como consecuencia de los bajos niveles de fosforilación de Erk1/2 probablemente contribuya al mantenimiento de altos niveles de Ras-GTP en estas células resistentes. Spred1 funciona como regulador *feedback* negativo de la activación de Ras, mediante el reclutamiento de NF1 a la membrana celular (Stowe *et al.*, 2012), y la pérdida de su expresión ha sido relacionada con la progresión de melanoma en mucosas (Ablain *et al.*, 2018; Newell *et al.*, 2019). No detectamos reducción de los niveles proteicos de Spred1 relativo a las células parentales, sugiriendo que Spred1 no estaría involucrado en el aumento de Ras-GTP en las células resistentes. Sin embargo, es posible que estén implicadas otras proteínas de la familia Sprouty (Spry1, Spry2), las cuales inhiben la activación de Ras mediante su unión a la proteína adaptadora Grb2 tras la estimulación de la ruta MAPK/ERK (Hanafusa *et al.*, 2002). El aumento de los niveles de Ras-GTP en las células resistentes también podría deberse a un incremento de la actividad GEF de SOS1, la cual es inhibida por fosfo-Erk2 (Kamioka *et al.*, 2010) y por fosfo-RSK2 (Saha *et al.*, 2012).

Los niveles de Ras-GTP en las células A375-ER disminuyeron parcialmente en respuesta a linsitinib, indicando que la activación de Ras es debida, al menos en parte, al incremento de la actividad de IGF-1R en estas células. Estos datos sugerirían que Ras podría contribuir a la activación de MEK5-Erk5 en dichas células. La implicación de Ras en la activación de Erk5 fue descrita en algunos tipos celulares (English *et al.*, 1998; English *et al.*, 1999; Kamakura *et al.*, 1999), mientras que en otros la activación de Erk5 es independiente de Ras (Kato *et al.*, 1998; Fukuhara *et al.*, 2000; Obara y Nakahata, 2010). La posible implicación de Ras en la activación de la vía IGF-1R-MEK5-Erk5 en células de melanoma resistentes a inhibidores de la ruta MAPK/ERK será objeto de futuros estudios.

2.3. Activación de la vía PI3K/Akt en células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a los tratamientos combinados de inhibidores de MAP quinasas

Además de inducir un incremento de activación de la vía MEK5/Erk5, el aumento de activación de IGF-1R se correlaciona con mayor fosforilación de Akt en las células resistentes a SCH o a las combinaciones de vemurafenib/trametinib o vemurafenib/SCH que en las células parentales. Más aún, el tratamiento con linsitinib inhibió la fosforilación de Akt en las células resistentes, indicando que dicha fosforilación es dependiente de IGF-1R. Este resultado coincide con datos previos que muestran que la actividad de IGF-1R induce la fosforilación de Akt y la supervivencia de células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF (Villanueva *et al.*, 2010). IGF-1R promueve el reclutamiento de la proteína adaptadora IRS1, la cual interacciona con la subunidad reguladora p85 de PI3K causando la activación de la ruta PI3K/Akt (Iams y Lovly, 2015). Puesto que PI3K puede ser asimismo activada por interacción directa con Ras-GTP (Fruman y Rommel, 2014), la mayor activación de Ras podría contribuir a la fosforilación de Akt en las células A375-ER.

Nuestros datos no nos han permitido concluir la posible implicación de PTEN en la regulación de la activación de Akt en las células resistentes a SCH, dados los resultados

diferentes obtenidos con las células A375-ER y SK-Mel 28-ER. Por otra parte, existe una regulación cruzada entre las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt. Así, la inhibición de MEK reduce el reclutamiento de PTEN a la membrana potenciando la activación de Akt (Zmajkovicova *et al.*, 2013), mientras que Erk1/2 fosforila la proteína adaptadora Gab1, lo que se traduce en una inhibición de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina (Lehr *et al.*, 2004), si bien esto no ha sido todavía estudiado con IGF. Por tanto, cabe la posibilidad de que la baja activación de la ruta MAPK/ERK pudiera favorecer la activación de Akt en las células resistentes. Asimismo, varios estudios proponen que Erk5 podría estimular Akt en respuesta a la activación de RTKs, regulando de este modo la supervivencia celular. En células endoteliales, Erk5 es requerido para la fosforilación de Akt inducida por VEGF a través de VEGFR-2 (Roberts *et al.*, 2010) o por PDGFR- β activado (Lennartsson *et al.*, 2010), y en células neuronales estimuladas con NGF, la activación de Erk5 causa a su vez el incremento de fosforilación de Akt (Finegan *et al.*, 2009). Dado que las células resistentes a SCH o a las combinaciones de vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH muestran altos niveles de fosfo-Akt de forma dependiente de IGF-1R, sería interesante estudiar la posible implicación de Erk5 en dicha fosforilación. Por el momento, la fosforilación directa de Akt por Erk5 no ha sido demostrada, por lo que es posible que ocurriera de forma indirecta a través de proteínas controladas por Erk5.

Frecuentemente, la activación de la ruta PI3K/Akt causa resistencia a inhibidores de BRAF y/o MEK en pacientes con melanoma (Shi, Hong, *et al.*, 2014; Shi, Hugo, *et al.*, 2014), y la combinación de inhibidores de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt es efectiva en modelos celulares de resistencia a dabrafenib y/o trametinib (Carlino, Todd *et al.*, 2014; Lassen *et al.*, 2014; Sweetlove *et al.*, 2015). No obstante, nuestros resultados mostraron que la inhibición de Akt solo causa una disminución moderada de la viabilidad de las células A375-ER, indicando que la vía PI3K/Akt posiblemente contribuya a la supervivencia de estas células, pero no presenta un papel esencial en la resistencia a SCH.

2.4. Sobreexpresión de IGFBP5 en células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a la inhibición de BRAF/MEK

La activación de IGF-1R está regulada por proteínas de la familia IGFBP, las cuales interaccionan con IGF-1 e IGF-2 pudiendo inhibir su unión al receptor y posterior activación (Baxter, 2014). Las proteínas IGFBP pueden también promover el crecimiento celular tanto de forma dependiente como independiente de IGF-1R, estando sobreexpresadas en varios tipos de cáncer (Baxter, 2014). Nuestros datos muestran que las células resistentes a SCH o a las combinaciones de inhibidores de la vía MAPK/ERK expresan mayores niveles de proteína y de mRNA de *IGFBP5* que las células parentales. El incremento de expresión de IGFBP5 fue asimismo observado en células con resistencia simple a vemurafenib (A375-VR). En nuestros modelos de resistencia a SCH o a la combinación de vemurafenib y trametinib en melanoma, los datos indican que IGFBP5 contribuye a la fosforilación de IGF-1R. En futuros estudios en los que se utilizarán células silenciadas establemente para IGFBP5, se determinará si esta proteína favorece la supervivencia celular y la resistencia de forma dependiente de IGF-1R en las células resistentes a SCH o a vemurafenib y trametinib. Nuestros resultados muestran un incremento de los niveles de *IGFBP5* en tumores de células parentales tras el tratamiento *in vivo* con vemurafenib y trametinib. Este aumento de *IGFBP5* tiene lugar paralelamente a la inhibición del crecimiento tumoral por estos inhibidores, de manera que sería

interesante estudiar su posible contribución al desarrollo de la resistencia *in vivo*. Dado que IGFBP5 es secretado a la circulación sanguínea y puede ser detectado en suero, podría constituir un potencial biomarcador de resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK.

IGFBP5 presenta funciones ambivalentes en cáncer, ya que puede tanto potenciar como inhibir el crecimiento tumoral, dependiendo del contexto celular (Baxter, 2014). Así, la sobreexpresión de IGFBP5 ha sido relacionada con supresión tumoral, mediante el bloqueo de la activación de IGF-1R (Ahn *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2013; Ghousaini *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2016; Neuzillet *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018). Por el contrario, otros estudios muestran que IGFBP5 puede inducir supervivencia, proliferación y/o resistencia a tratamiento en células tumorales, de forma dependiente o independiente de IGF (Tanno *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2012; Wang, Lim *et al.*, 2018). De esta manera, la elevada expresión de IGFBP5 en el tumor se correlaciona con una menor supervivencia de pacientes de cáncer de mama (Li *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2012; Wang, Lim *et al.*, 2018), entre otros tipos de cáncer. El papel de IGFBP5 en resistencia a tratamiento en melanoma no ha sido descrito por el momento. En el caso de IGFBP2, un estudio reciente muestra que el aumento de su expresión promueve la activación de IGF-1R y Akt, causando resistencia a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK en melanoma (Strub *et al.*, 2018). Por otra parte, no se conocen todavía los mecanismos por los cuales IGFBP5 puede estimular la activación de IGF-1R. En cuanto a IGFBP3, esta proteína es capaz de incrementar la activación de IGF-1R y EGFR mediante la estimulación de la producción de esfingosina-1-fosfato (S1P) en células epiteliales (Martin *et al.*, 2009).

2.5. Papel de las quinasas PAK en la activación de la vía MEK5-Erk5 y en la resistencia de células de melanoma a inhibidores de ERK o a la inhibición de BRAF/MEK

Las células de melanoma resistentes a inhibidores de ERK o a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK mostraron mayores niveles de activación de Rac1 (Rac1-GTP) que las células parentales, mientras que la activación de Cdc42 no sufrió alteraciones. Los mecanismos implicados en este aumento de activación de Rac1 no han sido estudiados en el presente trabajo. La mayor activación de Rac1 en las células resistentes podría estar basada en una posible mutación en Rac1^{P29S}, la cual genera una forma activa de Rac1 (Davis *et al.*, 2013) y constituye la tercera mutación de ganancia de función más frecuente en melanoma tras las alteraciones en BRAF y N-Ras (Hodis *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2012). Asimismo, el aumento de activación de Rac1 podría ser consecuencia de los altos niveles de Ras-GTP en estas células, puesto que Ras puede activar a Rac mediante el reclutamiento de Tiam1, un factor GEF de Rac (Lambert *et al.*, 2002; Malliri *et al.*, 2002) que está sobreexpresado en melanoma metastásico (Dalton *et al.*, 2013). A su vez, la activación de PI3K genera fosfatidil-inositol trifosfato, el cual puede estimular GEFs de Rac como P-Rex1 o P-Rex2 (Welch *et al.*, 2002; Welch, 2015). El aumento de activación de la vía PI3K-Akt en nuestras células resistentes podría traducirse en la producción de fosfatidil-inositol trifosfato, pudiendo así activar P-Rex1, cuya expresión se encuentra aumentada en melanoma (Lindsay *et al.*, 2011), y/o P-Rex2, la cual está mutada en aproximadamente el 14% de melanomas (Berger *et al.*, 2012).

Las proteínas PAK son activadas por Rac y Cdc42 (en el caso de PAK1-3), o bien exclusivamente por Cdc42 (en el caso de PAK4-6) (Radu *et al.*, 2014), y se ha mostrado

que la mutación Rac1^{P29S} induce activación de quinasas PAK en melanoma (Lionarons *et al.*, 2019). Se ha descrito anteriormente que la vía MEK5-Erk5 es activada por la quinasa PAK2 en células endoteliales, lo que regula la organización del citoesqueleto, la migración, el crecimiento y la supervivencia celular (Radu *et al.*, 2015). Las células de melanoma resistentes al inhibidor de ERK o a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK mostraron un aumento de la expresión del mRNA de *PAK1* y *PAK2*, aunque mayoritariamente detectamos el incremento de la expresión proteica y activación de PAK2. No obstante, los ensayos de silenciamiento de PAK2 en las células A375-ER y A375-VR/TR mostraron que la fosforilación de Erk5 es independiente de PAK2. La expresión de las diferentes isoformas de PAK está frecuentemente incrementada en cáncer (Radu *et al.*, 2014; Rane y Minden, 2019), y la sobreexpresión de PAK1 ha sido identificada en células de melanoma que expresan BRAF *wild type*, en las cuales induce proliferación y migración celular a través de la activación de la vía MAPK/ERK (Ong *et al.*, 2013). En células de melanoma que expresan BRAF^{V600E}, PAK1 y PAK2 están implicadas en resistencia a inhibidores de BRAF a través de la fosforilación de CRAF, así como en resistencia a la combinación inhibidores de BRAF y MEK mediante la activación de rutas de señalización alternativas a la vía MAPK/ERK, como PI3K/Akt, β -catenina y JNK (Lu *et al.*, 2017). Adicionalmente, el incremento de los niveles de PAK2 (Xiao *et al.*, 2018), así como el aumento de su activación mediado por IGF-1R (Zhang *et al.*, 2018), han sido relacionados con resistencia a terapia hormonal en cáncer de mama. PAK2 causa asimismo resistencia a la apoptosis inducida por quimioterapia en líneas celulares de cáncer de mama a través de la fosforilación e inhibición de caspasa 7 (Li *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de PAK2 en las células A375-VR/TR no afecta significativamente a su viabilidad, indicando que PAK2 no es requerido para la doble resistencia a vemurafenib y trametinib en estas células.

2.6. Papel de proteínas del ciclo celular en la resistencia de células de melanoma a inhibidores de ERK

Nuestros resultados muestran que las células resistentes a SCH presentan un aumento de la expresión de Cdk4, Cdk6 y Cdk2, las cuales están implicadas en la transición G₁-S del ciclo celular. Se ha demostrado previamente que las mutaciones activadoras de Cdk4 por sí solas no afectan a la sensibilidad a la inhibición de BRAF en líneas celulares de melanoma, aunque Cdk4 mutado o sobreexpresado en presencia de altos niveles de ciclina D1 disminuye la respuesta a los inhibidores de BRAF en células de melanoma (Smalley *et al.*, 2008). La sobreexpresión de ciclina D1 debida a la amplificación del gen *CCND1* ha sido descrita en pacientes con resistencia a inhibidores de BRAF (Smalley *et al.*, 2008; Nathanson *et al.*, 2013). Aunque las células A375-ER no mostraron sobreexpresión basal de ciclina D1, mantuvieron niveles superiores de ciclina D1 a los mostrados por las células parentales en presencia de SCH, lo cual les permitiría la progresión del ciclo celular.

La inhibición de Cdk4/6 induce senescencia en células de melanoma (Anders *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2014), incluso en células resistentes a vemurafenib (Yadav *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2018), por lo que constituyen dianas potenciales para el tratamiento del melanoma. A pesar del aumento de expresión de Cdk4/6, las células resistentes a SCH fueron insensibles al inhibidor de Cdk4/6 palbociclib, a diferencia de las células parentales. La sobreexpresión de Cdk4 ha sido relacionada tanto con sensibilidad a inhibidores de esta quinasa (Zhang *et al.*, 2014), como con resistencia (Olanich *et al.*,

2015), de manera que el aumento de expresión de Cdk4 en las células A375-ER podría disminuir su respuesta al palbociclib. Sin embargo, el silenciamiento combinado de Cdk4 y Cdk6 o de Cdk4 y Cdk2 tampoco afectó a la viabilidad de las células A375-ER en presencia de SCH, sugiriendo que la sobreexpresión de estas Cdks no es esencial para la resistencia a dicho inhibidor. Cabe mencionar la posibilidad de que existan mecanismos compensatorios entre las diferentes Cdks en los experimentos de tratamiento con palbociclib y de silenciamiento de Cdks, ya que en ausencia de actividad de Cdk4 y Cdk6, la ciclina D1 podría activar a Cdk2 y promover así la fosforilación de Rb y la progresión del ciclo celular (Malumbres *et al.*, 2004; Satyanarayana y Kaldis, 2009; Herrera-Abreu *et al.*, 2016). Por su parte, Cdk6 es capaz de unirse a ciclina D1, pero aparentemente esto no es suficiente para compensar la ausencia de Cdk4 y Cdk2, ya que ratones *knockout* para Cdk2 y Cdk4 muestran alteraciones en la progresión del ciclo celular y una disminución de la fosforilación de Rb (Berthet y Kaldis, 2006; Satyanarayana y Kaldis, 2009). Aun así, sería interesante estudiar el efecto del silenciamiento o inhibición simultánea de Cdk4, Cdk6 y Cdk2 en células resistentes. Sin embargo, debido a la dificultad de la realización de este triple silenciamiento, así como a la ausencia de inhibidores específicos de Cdk2, no hemos podido llevar a cabo dichos experimentos en este trabajo.

2.7. Posible papel de proteínas *scaffold* en la disminución de la activación de la vía MAPK/ERK en las células resistentes

La pérdida de la expresión o función de las denominadas proteínas *scaffold* como IQGAP1 o KSR, puede afectar negativamente a la activación de la vía MAPK/ERK (Lozano *et al.*, 2003; Jameson *et al.*, 2013; Casar y Crespo, 2016), por lo que podría representar un potencial mecanismo implicado en la reducción de la activación de Erk1/2 en las células resistentes. Nuestros resultados no mostraron disminución de la expresión de los mRNAs de *IQGAP1*, *KSR1* o *KSR2* en las células resistentes con respecto a las parentales. Por el contrario, observamos un fuerte incremento de la expresión de *KSR2*, y en menor medida de *KSR1*, en las células resistentes, mientras que la expresión de *IQGAP1* no varió significativamente en comparación con las células parentales. Se ha descrito que la sobreexpresión de KSR1 puede causar la disminución de la activación de Erk1/2, posiblemente debido a que altos niveles de KSR1 dificulten la interacción entre los componentes de la vía MAPK/ERK, dando lugar a la formación de complejos incompletos no funcionales (Levchenko *et al.*, 2000; Kortum y Lewis, 2004). La función de KSR1 también puede ser inhibida a través de su unión a otras proteínas como la ubiquitina ligasa E3 IMP (Matheny *et al.*, 2004; Matheny y White, 2009), la proteína adaptadora Erbin (Stevens *et al.*, 2018) o 14-3-3 (Müller *et al.*, 2001; Jagemann *et al.*, 2008), las cuales impiden la interacción de KSR1 con BRAF, MEK o ERK, y en consecuencia, la activación de la vía MAPK/ERK (Frodyma *et al.*, 2017). KSR2 es un regulador clave del metabolismo de glucosa y ácidos grasos mediante su interacción con AMPK (Costanzo-Garvey *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2012). Aunque no podemos descartar que la sobreexpresión de KSR2 en las células resistentes pudiera inhibir interacciones entre miembros de la ruta MAPK/ERK, cabe la posibilidad de que su aumento de expresión implique cambios en el metabolismo de estas células. Por su parte, la interacción de IQGAP1 con el factor de transcripción FOXO1 suprime la fosforilación de Erk1/2 en células tumorales (Pan *et al.*, 2017), mientras que la sumoilación de IQGAP1 promueve la activación de Erk1/2 y el crecimiento tumoral (Liang *et al.*, 2017). Por tanto, para estudiar con mayor profundidad el posible papel de

KSR1, KSR2 e IQGAP1 en la disminución de la activación de Erk1/2 en las células resistentes, sería conveniente determinar en primer lugar sus niveles proteicos y sus modificaciones post-traduccionales, así como examinar si ocurren alteraciones en las interacciones de estas proteínas con BRAF, MEK y/o ERK.

2.8. Recuperación de fosfo-Erk1/2 por TGF- α en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK

Dado que nuestras células resistentes presentan mínima activación de Erk1/2 incluso en ausencia de los inhibidores, esto nos llevó a investigar si una posible disminución de la actividad de algún factor del secretoma de estas células pudiera contribuir al mantenimiento de la baja activación de Erk1/2. Experimentos de intercambio de sobrenadantes mostraron que una parte importante de la fosforilación de Erk1/2 en las células A375-ER, SK-Mel 28-ER, A375-VR/TR y SK-Mel 28-VR/TR podía ser recuperada tras su exposición al medio condicionado por las células parentales. Notablemente, la recuperación de la fosforilación de Erk1/2 fue específicamente inhibida por anticuerpos neutralizantes de TGF- α , uno de los factores de crecimiento cuya expresión era menor en las células A375-ER que en las parentales. La reactivación de Erk1/2 por TGF- α añadido de forma exógena a las células resistentes fue mediada por su receptor EGFR, dado que fue bloqueada por el inhibidor de EGFR erlotinib. Asociado cinéticamente a la reactivación de Erk1/2 en las células resistentes, TGF- α indujo un aumento de la activación de CRAF y MEK1/2, sugiriendo la posibilidad de que la vía CRAF-MEK esté preferentemente inactiva en las células resistentes, y que la recuperación de fosfo-Erk1/2 tenga lugar a través de la estimulación de la ruta EGFR-CRAF-MEK1/2. La reactivación de Erk1/2 por TGF- α fue rápida y transitoria, aunque altos niveles de fosfo-Erk1/2 se mantuvieron al menos durante 8 horas. Dicha reactivación se correlacionó con una disminución progresiva de la expresión de EGFR, posiblemente involucrando la internalización y degradación del receptor (Longva *et al.*, 2002; Haglund y Dikic, 2012; Huang, Zeng *et al.*, 2013). La reactivación de Erk1/2 por TGF- α en las células resistentes probablemente estimule mecanismos *feedback* negativos dependientes de Erk1/2 que, junto con la reducción de la expresión de EGFR, atenuarían parcialmente la activación de esta vía.

La disminución de los niveles de TGF- α en el secretoma de las células resistentes se correlacionó con una menor expresión de su mRNA (*TGFA*) con respecto a las células parentales. El tratamiento de las células parentales con vemurafenib y trametinib o con SCH redujo la expresión de *TGFA*, mientras que la sobreexpresión de BRAF^{V600E} en melanocitos causó un incremento de la activación de Erk1/2 asociado a un aumento de la expresión de *TGFA*. Estos resultados conjuntamente sugieren que la expresión de *TGFA* es estimulada en células de melanoma de un modo dependiente de la activación de Erk1/2. Estudios iniciales de la regulación de la expresión de *TGFA* mostraron que su transcripción es inducida por TGF- α de forma autocrina (Untawale *et al.*, 1993), así como por otros ligandos de la familia EGF (Barnard *et al.*, 1994). Por tanto, dado que la vía MAPK/ERK es activada por TGF- α , Erk1/2 podría participar en el proceso de auto-inducción de la expresión de *TGFA*. De acuerdo con esto, se ha descrito recientemente la estimulación de la expresión de *TGFA* en respuesta a la activación de la ruta MAPK/ERK en cáncer de próstata (Li *et al.*, 2019). Así pues, la reducción de la expresión de TGF- α en las células resistentes sería probablemente una consecuencia de la disminución de la activación de Erk1/2, originándose un *loop* que contribuiría a mantener los bajos niveles de fosfo-

Erk1/2 mediante la disminución de la señalización dependiente de la interacción TGF- α /EGFR.

Las células resistentes a SCH o a la combinación de vemurafenib y trametinib mostraron un aumento considerable de la expresión de EGFR, tanto de mRNA como de proteína, en comparación con las células parentales. La sobreexpresión de EGFR ha sido descrita previamente en células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF, habiéndose demostrado que constituye un mecanismo de resistencia a dichos inhibidores (Girotti *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014). El aumento de expresión de EGFR en estas células de melanoma resistentes puede ser consecuencia de la disminución de la expresión del factor de transcripción SOX10 y de la activación de la señalización por TGF- β (Sun *et al.*, 2014), así como de la pérdida de metilación de elementos reguladores del gen *EGFR* (Wang, Huang *et al.*, 2015). Se ha propuesto asimismo que MITF podría regular negativamente la expresión y activación de EGFR en células de melanoma, ya que células resistentes a vemurafenib que sobreexpresan EGFR muestran una disminución de los niveles de MITF (Ji *et al.*, 2015). Estos datos concordarían con la pérdida de MITF y el aumento de expresión de EGFR que hemos observado en las células A375-ER. No obstante, los análisis de *arrays* de RTKs mostraron menor activación de EGFR en las células A375-ER que en las parentales, a pesar de que las primeras sobreexpresan EGFR. Aunque no hemos llevado a cabo experimentos con erlotinib, los resultados iniciales obtenidos con lapatinib, el cual inhibe tanto a ErbB2 como a EGFR, indican que EGFR no estaría implicado en la resistencia a SCH.

Si bien EGFR no se encuentra basalmente más activo en las células A375-ER que en las parentales, la capacidad de reactivación de la ruta MAPK/ERK en las células resistentes en respuesta a TGF- α probablemente esté relacionada con su elevada expresión de EGFR. Se ha descrito que la disminución de fosfo-Erk1/2 tras la inhibición de BRAF o MEK provoca la pérdida parcial de la regulación negativa de los RTKs y Ras dependiente de Erk1/2 en células de melanoma, y la consecuente recuperación de la sensibilidad a los ligandos de los RTKs (Lito *et al.*, 2012). Por consiguiente, los bajos niveles de fosfo-Erk1/2 en las células resistentes favorecerían la activación de EGFR y la vía MAPK/ERK tras la estimulación con TGF- α . Por el contrario, los niveles de fosfo-Erk1/2 no varían significativamente en respuesta a este ligando en las células parentales, las cuales presentan reducida expresión de EGFR, y presumiblemente, una fuerte regulación negativa de RTKs y Ras asociada a la elevada activación de Erk1/2.

En conjunto, nuestros datos indican que la disminución de la expresión de TGF- α probablemente contribuya a mantener bajos niveles de fosforilación de Erk1/2 en nuestras células resistentes. Asimismo, estos resultados sugieren la posibilidad de que las células resistentes con reducida activación de Erk1/2 y elevada fosforilación de Erk5 en un tumor pudieran activar EGFR y reactivar la vía MAPK/ERK en presencia de TGF- α . Este incremento de activación de la ruta MAPK/ERK podría aumentar todavía más el crecimiento tumoral y la resistencia, puesto que la reactivación de Erk1/2 por TGF- α exógeno en las células resistentes se correlacionó con un moderado incremento de su proliferación y de su viabilidad en presencia de SCH. Dada la elevada plasticidad y heterogeneidad intratumoral en melanoma (Shi, Hugo, *et al.*, 2014), TGF- α podría proceder de otras células de melanoma con elevada activación de Erk1/2 presentes en el tumor. Además, otros tipos celulares presentes en el microambiente tumoral podrían

representar fuentes adicionales de TGF- α . Por ejemplo, TGF- α puede ser expresado por macrófagos (Madtes *et al.*, 1988; Rappolee *et al.*, 1988) y por fibroblastos (Cheng *et al.*, 2005), por lo que cabe la posibilidad de que dicho mitógeno secretado por estas células asociadas al tumor pudiera reactivar Erk1/2 y promover la proliferación y la resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en células de melanoma.

2.9. Modelo de resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en células de melanoma

Colectivamente, la caracterización molecular de células resistentes al inhibidor de ERK o a las combinaciones de inhibidores de BRAF/MEK o BRAF/ERK nos lleva a proponer el modelo mostrado en la **Figura 84**. Se ha demostrado previamente que en células de melanoma con la mutación BRAF^{V600E}, la elevada activación de la vía MAPK/ERK promueve proliferación y supervivencia de forma dependiente de Erk1/2, a la vez que induce mecanismos reguladores negativos que inhiben la señalización mediada por RTKs y la activación de Ras (**Figura 84A**). Erk1/2 regula la expresión de TGF- α , aunque éste no contribuiría significativamente a la activación de la ruta MAPK/ERK debido al fuerte *feedback* negativo sobre RTKs y a la baja expresión de EGFR en estas células (**Figura 84A**).

Las células de melanoma resistentes a la inhibición combinada de BRAF y MEK pueden mostrar tanto reactivación como inhibición de Erk1/2 (Long, Fung *et al.*, 2014; Moriceau *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2017). Las células resistentes a SCH o a las combinaciones de vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH que hemos generado y utilizado en la presente Tesis han mostrado un bloqueo de la vía MAPK/ERK, el cual es compensado por el incremento de expresión y activación de IGF-1R. Esto se traduce en la estimulación de la ruta IGF-1R-MEK5-Erk5 en dichas células, induciendo proliferación y supervivencia de forma independiente de Erk1/2 (**Figura 84B**). Además, el aumento de actividad de IGF-1R en las células resistentes causa un incremento de los niveles de Ras-GTP y de la fosforilación de Akt, aunque esta última no parece esencial para la resistencia. Por su parte, la pérdida del *feedback* negativo sobre RTKs y Ras dependiente de fosfo-Erk1/2 probablemente facilite la señalización por IGF-1R, así como la respuesta a factores de crecimiento exógenos como TGF- α , favorecida a su vez por el aumento de expresión de EGFR (**Figura 84B**). La reducida activación de Erk1/2 en las células resistentes causa asimismo la disminución de la expresión de TGF- α , la cual contribuiría al mantenimiento de la baja activación de Erk1/2 en estas células.

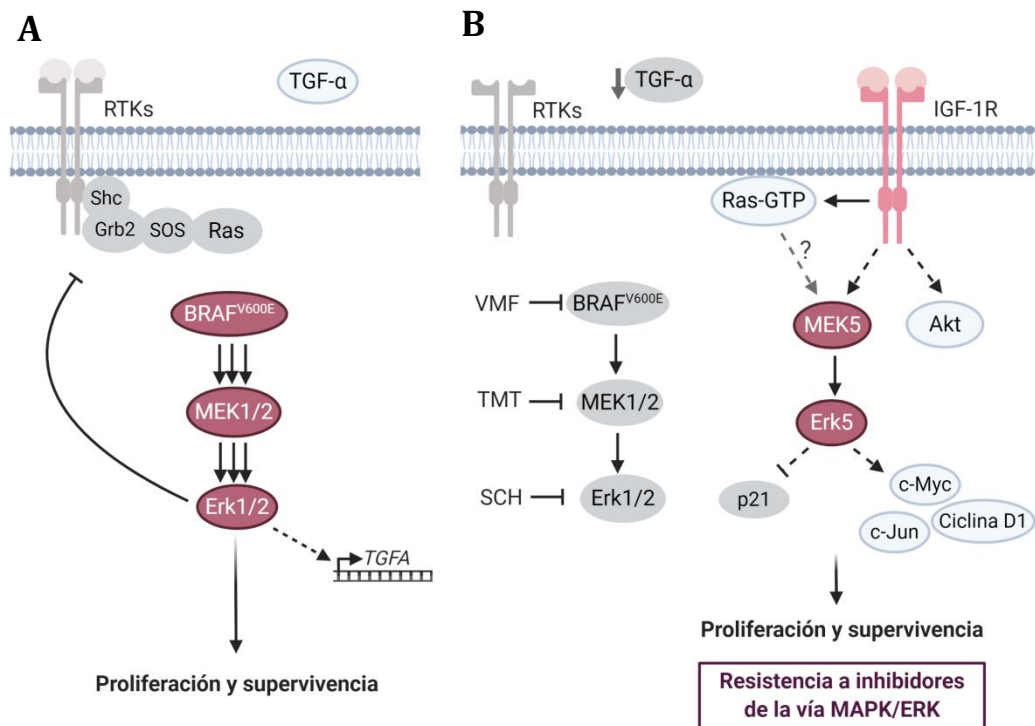


Figura 84. Modelo de resistencia a inhibidores de la vía MAPK/ERK en células de melanoma. Se muestra la activación de la vía MAPK/ERK en células parentales (A), y la activación de la ruta IGF-1R-MEK5-Erk5 en células resistentes a inhibidores de la vía MAPK/ERK (B). Se indica asimismo la reducción de la expresión de TGF-α en las células resistentes comparado con las células parentales. Las líneas discontinuas señalan mecanismos indirectos de regulación, mientras que la línea gris discontinua indica que la activación de MEK5-Erk5 por Ras no ha sido demostrada en estas células.

3. miR-204-5p y miR-211-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib

Si bien la resistencia a inhibidores de BRAF en melanoma se asocia frecuentemente a alteraciones genéticas que conllevan la reactivación de la vía MAPK/ERK o la activación de la vía PI3K/Akt, mecanismos post-transcripcionales basados en cambios en la expresión de miRNAs pueden asimismo contribuir a dicha resistencia (Stark *et al.*, 2015; Fattore *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016). En la Tesis Doctoral de Marta Díaz Martínez (2017), se generaron células A375 resistentes a vemurafenib (A375-VR) para posteriormente estudiar alteraciones en sus perfiles de expresión de miRNAs con respecto a las células parentales, y su posible implicación en la resistencia al inhibidor. Los análisis de RNAseq y qPCR revelaron, entre otros, un aumento de los niveles de miR-204-5p y miR-211-5p, junto con una disminución de la expresión de miR-140-3p en las células A375-VR. Más aún, se observó que la sobreexpresión de miR-204-5p o de miR-211-5p en las células parentales confería una moderada pero significativa ventaja de supervivencia *in vitro* en presencia de vemurafenib, mientras que la disminución de la expresión de miR-140-3p no alteró la supervivencia. De forma similar, los transductantes Triple-miR mostraron mayor resistencia a vemurafenib en ensayos *in vitro* que los transductantes control. En la

presente Tesis Doctoral hemos ampliado estos estudios y mostrado que los tumores de células A375 Triple-miR presentan mayor crecimiento en ratones NSG en presencia de vemurafenib que los tumores de células transductantes control, corroborando *in vivo* la contribución de miR-204-5p y miR-211-5p a la resistencia a vemurafenib.

Asimismo, hemos observado que la sobreexpresión de miR-204-5p se correlaciona con un aumento de la expresión del gen *TRPM3* en las células A375-VR, el cual contiene la secuencia codificante de miR-204. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la expresión de miR-204 y *TRPM3* está regulada por mecanismos comunes (Courboulín *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2014). Aunque comparado con las células parentales, las células A375-VR presentan un incremento de los niveles de *PAX6*, un factor de transcripción que regula la expresión de *TRPM3* y miR-204 (Shaham *et al.*, 2013), el aumento de expresión de miR-204-5p en las células resistentes resultó ser independiente de *PAX6*. Por el contrario, la expresión de miR-204-5p disminuyó significativamente tras el silenciamiento de *STAT3* en las células A375-VR. *STAT3* regula la expresión de miR-204-5p en células de melanoma (Vitiello *et al.*, 2017), y además, el aumento de activación de *STAT3* ha sido descrito en resistencia a inhibidores de BRAF (Girotti *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren la implicación de este factor de transcripción en el incremento de miR-204-5p en células de melanoma resistentes a vemurafenib.

Por otra parte, las células A375-VR presentaban un aumento de expresión del mRNA de *TRPM1* (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017), el cual contiene la secuencia codificante de miR-211 (Levy *et al.*, 2010). El factor de transcripción MITF regula la expresión tanto de *TRPM1* (Miller *et al.*, 2004) como de miR-211 (Vitiello *et al.*, 2017). Sin embargo, el silenciamiento de MITF en las células A375-VR no alteró de forma significativa la expresión de miR-211-5p, a pesar del aumento de la actividad de este factor de transcripción en estas células. Estos resultados sugieren que MITF no presenta un papel relevante en el incremento de expresión de miR-211-5p en las células resistentes a vemurafenib, por lo que otros mecanismos deben estar implicados en la regulación de este miRNA en dichas células. Un posible mecanismo regulador de la expresión de miR-211-5p podría proceder de PERK, un componente clave de la respuesta a estrés por proteínas mal plegadas (Chitnis *et al.*, 2012; Bu *et al.*, 2018), así como de NF- κ B, el cual presenta sitios de unión en el promotor de miR-211 (Wang, Li *et al.*, 2018).

El análisis de la expresión de mRNAs diana de miR-204-5p y/o miR-211-5p había sido previamente realizado (Tesis Doctoral, Marta Díaz Martínez, 2017). En la presente Tesis hemos determinado los niveles proteicos de las dianas de estos miRNAs. Los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de NUA1 en las células A375-VR, así como en los transductantes que sobreexpresan miR-211-5p y en los transductantes Triple-miR. Se ha mostrado previamente que NUA1/ARK5 es una diana común de miR-204-5p y miR-211-5p (Bell *et al.*, 2014; Shi, Zhang *et al.*, 2014), aunque no observamos cambios significativos de su expresión en los transductantes que sobreexpresan miR-204-5p, sugiriendo que NUA1 es mayoritariamente diana de miR-211-5p en las células A375-VR. No obstante, sería necesario silenciar miR-204-5p en las células A375-VR para determinar con mayor seguridad si NUA1 no constituye una diana de este miRNA en estas células. NUA1 es una quinasa relacionada con AMPK que promueve supervivencia, migración y metástasis de células tumorales (Sun *et al.*, 2013; Monteverde *et al.*, 2015). No obstante, NUA1 presenta asimismo funciones supresoras

tumorales (Humbert *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011), y puede ser fosforilada y activada por el supresor tumoral LKB1 (Lizcano *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2011). Curiosamente, LKB1 puede ser fosforilado por Erk1/2 y por RSK en líneas celulares de melanoma que presentan la mutación BRAF^{V600E}, impidiendo la activación de AMPK por LKB1 e incrementando así la proliferación celular (Zheng *et al.*, 2009). Por el momento, se desconoce si la mutación BRAF^{V600E} podría causar una inhibición de la unión de LKB1 a NUA1 y de la activación de esta última, lo que favorecería de este modo la proliferación celular. Nuestros resultados abren la posibilidad de que la disminución de la expresión de NUA1 causada por el aumento de miR-211-5p, y en consecuencia la pérdida de sus potenciales acciones supresoras tumorales, pudiera favorecer la resistencia a vemurafenib, una hipótesis que podría ser estudiada en el futuro.

Por otra parte, miR-211 promueve la supervivencia celular en presencia de estrés de retículo endoplásmico (RE) mediante la inhibición de la expresión de CHOP (Chitnis *et al.*, 2012). CHOP es un factor de transcripción pro-apoptótico implicado en la respuesta a proteínas mal plegadas, cuya expresión es inducida tras la activación de PERK (Walter y Ron, 2011). Las células A375-VR mostraron una disminución de los niveles de CHOP en presencia de estrés de RE en comparación con las células parentales. La respuesta a estrés de RE dependiente de PERK y asociada a un incremento de los niveles nucleares de CHOP ha sido relacionada con la inducción de autofagia en células de melanoma tratadas con un inhibidor de BRAF, reduciendo la apoptosis y limitando así la eficacia del tratamiento (Ma *et al.*, 2014). Dichos resultados sugerirían que CHOP podría favorecer la resistencia temprana al tratamiento. No obstante, estudios recientes muestran que el aumento de expresión de CHOP en respuesta a estrés de RE causado por inhibidores de BRAF disminuye la viabilidad, proliferación y metástasis de células de melanoma (Niessner *et al.*, 2017; Mantso *et al.*, 2018; Alves-Fernandes *et al.*, 2019; Chiu *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que la disminución de CHOP por miR-211-5p podría contribuir a la supervivencia de las células A375-VR resistentes a vemurafenib.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH772984 o a las combinaciones de vemurafenib y trametinib o vemurafenib y SCH772984 muestran bajos niveles de activación de Erk1/2 y un incremento en la activación de la vía MEK5/Erk5.
2. La activación de la vía MEK5-Erk5 promueve la supervivencia y la proliferación de las células A375 y SK-Mel 28 resistentes a SCH772984 y a los tratamientos combinados de inhibidores de MAP quinasas.
3. Las células A375 y SK-Mel 28 resistentes incrementan la expresión y la activación de IGF-1R, la cual es requerida para la activación de Erk5 dependiente de MEK5.
4. La inhibición de IGF-1R reduce la viabilidad y la proliferación *in vitro* de las células resistentes, así como el crecimiento de tumores de células resistentes a SCH772984 en ratones NSG.
5. La expresión de IGFBP5 está incrementada en las células A375 y SK-Mel 28 resistentes, probablemente contribuyendo a la activación de IGF-1R.
6. Las células A375 y SK-Mel 28 resistentes muestran un aumento de expresión de EGFR y una disminución de los niveles de TGF- α . La expresión de TGF- α está regulada por la vía MAPK/ERK.
7. La activación de Erk1/2 en las células A375 y SK-Mel 28 resistentes puede ser recuperada por TGF- α .
8. STAT3 induce la expresión de miR-204-5p en células A375 resistentes a vemurafenib, mientras que la expresión de miR-211-5p es independiente de MITF.
9. El incremento de expresión de miR-211-5p se correlaciona con la disminución de los niveles proteicos de NUA1 y CHOP en células A375 resistentes a vemurafenib.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abe, H. *et al.* (2011) 'Discovery of a highly potent and selective MEK inhibitor: GSK1120212 (JTP-74057 DMSO solvate)', *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2(4), pp. 320–324. doi: 10.1021/ml200004g.
- Ablain, J. *et al.* (2018) 'Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma', *Science*, 362(6418), pp. 1055–1060. doi: 10.1126/science.aau6509.
- Abraham, D. *et al.* (2000) 'Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(29), pp. 22300–4. doi: 10.1074/jbc.M003259200.
- Ahn, B. Y. *et al.* (2010) 'Genetic screen identifies insulin-like growth factor binding protein 5 as a modulator of tamoxifen resistance in breast cancer', *Cancer Research*, 70(8), pp. 3013–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3108.
- Akbani, R. *et al.* (2015) 'Genomic Classification of Cutaneous Melanoma', *Cell*, 161(7), pp. 1681–1696. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044.
- Van Allen, E. M. *et al.* (2014) 'The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma', *Cancer Discovery*, 4(1), pp. 94–109. doi: 10.1158/2159-8290.cd-13-0617.
- Alves-Fernandes, D. K. *et al.* (2019) 'ER stress promotes antitumor effects in BRAFi/MEKi resistant human melanoma induced by natural compound 4-nerolidylcatechol (4-NC)', *Pharmacological Research*, 141, pp. 63–72. doi: 10.1016/j.phrs.2018.12.006.
- Anastas, J. N. *et al.* (2014) 'WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors.', *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), pp. 2877–90. doi: 10.1172/JCI70156.
- Anders, L. *et al.* (2011) 'A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells', *Cancer Cell*, 20(5), pp. 620–34. doi: 10.1016/j.ccr.2011.10.001.
- Anjum, R. y Blenis, J. (2008) 'The RSK family of kinases: Emerging roles in cellular signalling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), pp. 747–758. doi: 10.1038/nrm2509.
- Antoon, J. W. *et al.* (2013) 'MEK5/ERK5 signaling suppresses estrogen receptor expression and promotes hormone-independent tumorigenesis', *PLoS ONE*, 8(8), p. e69291. doi: 10.1371/journal.pone.0069291.
- Aoki, K. *et al.* (2011) 'Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), pp. 12675–12680. doi: 10.1073/pnas.1104030108.
- Arkell, R. S. *et al.* (2008) 'DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5', *Cellular Signalling*, 20(5), pp. 836–843. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.12.014.
- Aronov, A. M. *et al.* (2009) 'Structure-guided design of potent and selective pyrimidylpyrrole inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERK) using conformational control', *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(20), pp. 6362–6368. doi: 10.1021/jm900630q.

Arozarena, I. y Wellbrock, C. (2017) 'Overcoming resistance to BRAF inhibitors', *Annals of Translational Medicine*, 5(19), pp. 1–12. doi: 10.21037/atm.2017.06.09.

Arozarena, I. y Wellbrock, C. (2019) 'Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance', *Nature Reviews Cancer*, 19(7), pp. 377–391. doi: 10.1038/s41568-019-0154-4.

Artandi, S. E. y DePinho, R. A. (2010) 'Telomeres and telomerase in cancer', *Carcinogenesis*, 31(1), pp. 9–18. doi: 10.1093/carcin/bgp268.

Ascierto, P. A. *et al.* (2016) 'Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*, 17(9), pp. 1248–1260. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30122-X.

Atay, C. *et al.* (2019) 'BRAF targeting sensitizes resistant melanoma to cytotoxic T cells', *Clinical Cancer Research*, 25(9), pp. 2783–2794. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2725.

Atkins, M. B. *et al.* (2000) 'High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: Long-term survival update', *Cancer Journal from Scientific American*, 6(SUPPL. 1).

B

Balch, C. M. *et al.* (2009) 'Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification', *Journal of Clinical Oncology*, 27(36), pp. 6199–6206. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799.

Ballif, B. A. *et al.* (2005) 'Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), pp. 667–672. doi: 10.1073/pnas.0409143102.

Barnard, J. A. *et al.* (1994) 'Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor- related peptide family', *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), pp. 22817–22822.

Bartel, D. P. (2009) 'MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions', *Cell*, 136(2), pp. 215–233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.

Bartel, D. P. (2018) 'Metazoan MicroRNAs', *Cell*, 173(1), pp. 20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.

Bartolomé, R. A. *et al.* (2009) 'The Chemokine Receptor CXCR4 and the Metalloproteinase MT1-MMP Are Mutually Required during Melanoma Metastasis to Lungs', *American Journal of Pathology*, 174(2), pp. 602–612. doi: 10.2353/ajpath.2009.080636.

Bastian, B. C. (2014) 'The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), pp. 239–271. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104658.

Baxter, R. C. (2014) 'IGF binding proteins in cancer: Mechanistic and clinical insights', *Nature Reviews Cancer*, 14(5), pp. 329–341. doi: 10.1038/nrc3720.

Becker, M. A. *et al.* (2012) 'IGFBP ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors', *Clinical Cancer Research*, 18(6), pp. 1808–1817. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1806.

- Bell, R. E. *et al.* (2014) 'Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1', *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), pp. 441–451. doi: 10.1038/jid.2013.340.
- Berger, M. F. *et al.* (2012) 'Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations', *Nature*, 485(7399), pp. 502–506. doi: 10.1038/nature11071.
- Berthet, C. y Kaldis, P. (2006) 'Cdk2 and Cdk4 cooperatively control the expression of Cdc2', *Cell Division*, 1, p. 10. doi: 10.1186/1747-1028-1-10.
- Birck, A. *et al.* (2000) 'Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies', *The Journal of Investigative Dermatology*, 114(2), pp. 277–80. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00877.x.
- Boga, S. B. *et al.* (2018) 'MK-8353: Discovery of an Orally Bioavailable Dual Mechanism ERK Inhibitor for Oncology', *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(7), pp. 761–767. doi: 10.1021/acsmedchemlett.8b00220.
- Boggan, T. J. y Eck, M. J. (2004) 'Structure and regulation of Src family kinases', *Oncogene*, 23(48), pp. 7918–27. doi: 10.1038/sj.onc.1208081.
- Bohnsack, M. T., Czapinski, K. and Görlich, D. (2004) 'Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs', *RNA*, 10(2), pp. 185–191. doi: 10.1261/rna.5167604.
- Bollag, G. *et al.* (2010) 'Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma', *Nature*, 467(7315), pp. 596–9. doi: 10.1038/nature09454.
- Bollag, G. *et al.* (2012) 'Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer', *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(11), pp. 873–86. doi: 10.1038/nrd3847.
- Bonazzi, V. F., Stark, M. S. and Hayward, N. K. (2012) 'MicroRNA regulation of melanoma progression', *Melanoma Research*, 22(2), pp. 101–113. doi: 10.1097/CMR.0b013e32834f6fbb.
- Boyle, G. M. *et al.* (2011) 'Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor', *Pigment Cell and Melanoma Research*, 24(3), pp. 525–537. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00849.x.
- Brennan, D. F. *et al.* (2011) 'A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK', *Nature*, 472(7343), pp. 366–9. doi: 10.1038/nature09860.
- Brummer, T. *et al.* (2003) 'Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf', *Oncogene*, 22(55), pp. 8823–8834. doi: 10.1038/sj.onc.1207185.
- Brunet, A., Pagès, G. y Pouyssegur, J. (1994) 'Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1)', *FEBS Letters*, 346(2–3), pp. 299–303. doi: 10.1016/0014-5793(94)00475-7.
- Bu, Y. *et al.* (2018) 'A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival', *Nature Cell Biology*, 20(1), pp. 104–115. doi: 10.1038/s41556-017-0006-y.
- Bustos, M. A. *et al.* (2017) 'MiR-200a Regulates CDK4/6 Inhibitor Effect by Targeting CDK6 in Metastatic Melanoma', *The Journal of Investigative Dermatology*, 137(9), pp. 1955–1964. doi: 10.1016/j.jid.2017.03.039.

C

- Cacace, A. M. *et al.* (1999) 'Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression', *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), pp. 229–40. doi: 10.1128/mcb.19.1.229.
- Caporali, S. *et al.* (2019) 'MiR-126-3p down-regulation contributes to dabrafenib acquired resistance in melanoma by up-regulating ADAM9 and VEGF-A', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). doi: 10.1186/s13046-019-1238-4.
- Carey, T. E. *et al.* (1976) 'Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(9), pp. 3278–3282. doi: 10.1073/pnas.73.9.3278.
- Carlino, M. S., Haydu, L. E. *et al.* (2014) 'Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma', *British Journal of Cancer*, 111(2), pp. 292–299. doi: 10.1038/bjc.2014.287.
- Carlino, M. S., Todd, J. R. *et al.* (2014) 'Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma', *Molecular Oncology*, 8(3), pp. 544–554. doi: 10.1016/j.molonc.2014.01.003.
- Carlino, M. S. *et al.* (2015) 'Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients', *Clinical Cancer Research*, 21(1), pp. 98–105. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0759.
- Carriere, A. *et al.* (2011) 'ERK1/2 phosphorylate raptor to promote ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1)', *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), pp. 567–577. doi: 10.1074/jbc.M110.159046.
- Casar, B. *et al.* (2009) 'Ras subcellular localization defines extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 substrate specificity through distinct utilization of scaffold proteins', *Molecular and Cellular Biology*, 29(5), pp. 1338–53. doi: 10.1128/MCB.01359-08.
- Casar, B. y Crespo, P. (2016) 'ERK Signals: Scaffolding Scaffolds?', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(MAY), p. 49 doi: 10.3389/fcell.2016.00049.
- Castro, N. E. y Lange, C. A. (2010) 'Breast tumor kinase and extracellular signal-regulated kinase 5 mediate Met receptor signaling to cell migration in breast cancer cells', *Breast Cancer Research*, 12(4). doi: 10.1186/bcr2622.
- Catalanotti, F. *et al.* (2009) 'A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal', *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3), pp. 294–303. doi: 10.1038/nsmb.1564.
- Catalanotti, F. *et al.* (2013) 'Phase II trial of MEK inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with BRAFV600E/K-mutated melanoma', *Clinical Cancer Research*, 19(8), pp. 2257–64. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3476.
- Caunt, C. J. *et al.* (2015) 'MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road', *Nature Reviews Cancer*, 15(10), pp. 577–92. doi: 10.1038/nrc4000.
- Chaikuad, A. *et al.* (2014) 'A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics', *Nature Chemical Biology*, 10(10), pp. 853–60. doi: 10.1038/nchembio.1629.

- Chapman, P. B. *et al.* (2011) 'Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation', *New England Journal of Medicine*, 364(26), pp. 2507–2516. doi: 10.1056/NEJMoa1103782.
- Chapman, P. B. *et al.* (2017) 'Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study', *Annals of Oncology*, 28(10), pp. 2581–2587. doi: 10.1093/annonc/mdx339.
- Charni, S. *et al.* (2009) 'ERK5 Knockdown Generates Mouse Leukemia Cells with Low MHC Class I Levels That Activate NK Cells and Block Tumorigenesis', *The Journal of Immunology*, 182(6), pp. 3398–3405. doi: 10.4049/jimmunol.0803006.
- Cheng, N. *et al.* (2005) 'Loss of TGF- β type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF- α -, MSP- and HGF-mediated signaling networks', *Oncogene*, 24(32), pp. 5053–5068. doi: 10.1038/sj.onc.1208685.
- Chitnis, N. S. *et al.* (2012) 'miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner', *Molecular Cell*, 48(3), pp. 353–64. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.025.
- Chiu, C. S. *et al.* (2019) 'Exploiting Honokiol-induced ER stress CHOP activation inhibits the growth and metastasis of melanoma by suppressing the MITF and β -catenin pathways', *Cancer Letters*, 442, pp. 113–125. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.026.
- Choi, H.-J. *et al.* (2018) 'Role of RBP2-Induced ER and IGF1R-ErbB Signaling in Tamoxifen Resistance in Breast Cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 110(4). doi: 10.1093/jnci/djx207.
- Cleghon, V. y Morrison, D. K. (1994) 'Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(26), pp. 17749–55.
- Contador-Troca, M. *et al.* (2015) 'Dioxin receptor regulates aldehyde dehydrogenase to block melanoma tumorigenesis and metastasis', *Molecular Cancer*, 14(1), p. 148. doi: 10.1186/s12943-015-0419-9.
- Cook, S. J. *et al.* (2017) 'Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling', *The FEBS Journal*, 284(24), pp. 4177–4195. doi: 10.1111/febs.14122.
- Corbalan-Garcia, S. *et al.* (1996) 'Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2.', *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), pp. 5674–5682. doi: 10.1128/mcb.16.10.5674.
- Costanzo-Garvey, D. L. *et al.* (2009) 'KSR2 is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity', *Cell Metabolism*, 10(5), pp. 366–78. doi: 10.1016/j.cmet.2009.09.010.
- Courboulain, A. *et al.* (2011) 'Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension', *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), pp. 535–548. doi: 10.1084/jem.20101812.
- Crosby, T. *et al.* (2000) 'Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2000(2), p. CD001215. doi: 10.1002/14651858.CD001215.
- Cui, R. *et al.* (2007) 'Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation', *Cell*, 128(5), pp. 853–864. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.045.

Curtin, J. A. *et al.* (2005) 'Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma', *New England Journal of Medicine*, 353(20), pp. 2135–2147. doi: 10.1056/NEJMoa050092.

Curtin, J. A. *et al.* (2006) 'Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), pp. 4340–4346. doi: 10.1200/JCO.2006.06.2984.

D

Dalton, L. E. *et al.* (2013) 'Constitutive rac activation is not sufficient to initiate melanocyte neoplasia but accelerates malignant progression', *Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), pp. 1572–1581. doi: 10.1038/jid.2013.23.

Damsky, W. E. *et al.* (2011) 'β-Catenin Signaling Controls Metastasis in Braf-Activated Pten-Deficient Melanomas', *Cancer Cell*, 20(6), pp. 741–754. doi: 10.1016/j.ccr.2011.10.030.

Damsky, W. E. y Bosenberg, M. (2017) 'Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship', *Oncogene*, 36(42), pp. 5771–5792. doi: 10.1038/onc.2017.189.

Dankort, D. *et al.* (2009) 'BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma', *Nature Genetics*, 41(5), pp. 544–552. doi: 10.1038/ng.356.

Davies, H. *et al.* (2002) 'Mutations of the BRAF gene in human cancer', *Nature*, 417(6892), pp. 949–954. doi: 10.1038/nature00766.

Davies, M. A. *et al.* (2008) 'A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines', *British Journal of Cancer*, 99(8), pp. 1265–1268. doi: 10.1038/sj.bjc.6604637.

Davis, M. J. *et al.* (2013) 'RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), pp. 912–7. doi: 10.1073/pnas.1220895110.

Delord, J.-P. *et al.* (2017) 'Phase I Dose-Escalation and -Expansion Study of the BRAF Inhibitor Encorafenib (LGX818) in Metastatic BRAF-Mutant Melanoma', *Clinical Cancer Research*, 23(18), pp. 5339–5348. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2923.

Devitt, B. *et al.* (2011) 'Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(4), pp. 666–72. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00873.x.

Dhillon, A. S. *et al.* (2002) 'Cyclic AMP-Dependent Kinase Regulates Raf-1 Kinase Mainly by Phosphorylation of Serine 259', *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), pp. 3237–3246. doi: 10.1128/mcb.22.10.3237-3246.2002.

Díaz Martínez, M. (2017) 'Papel de Src quinasas en invasión y de microRNAs en resistencia a quimioterapia en células de melanoma', Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

Dougherty, M. K. *et al.* (2005) 'Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation', *Molecular Cell*, 17(2), pp. 215–24. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.055.

Dréno, B. *et al.* (2017) 'Incidence, course, and management of toxicities associated with cobimetinib in combination with vemurafenib in the coBRIM study', *Annals of Oncology*, 28(5), pp. 1137–1144. doi: 10.1093/annonc/mdx040.

Duggan, M. C. *et al.* (2017) 'Identification of NRAS isoform 2 overexpression as a mechanism facilitating BRAF inhibitor resistance in malignant melanoma', *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(36), pp. 9629–9634. doi: 10.1073/pnas.1704371114.

Dumaz, N. *et al.* (2006) 'In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling', *Cancer Research*, 66(19), pp. 9483–91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4227.

Dummer, R. *et al.* (2017) 'Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*, 18(4), pp. 435–445. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30180-8.

Dummer, R. *et al.* (2018) 'Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*, 19(10), pp. 1315–1327. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30497-2.

E

Eblen, S. T. *et al.* (2004) 'Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion', *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), pp. 2308–2317. doi: 10.1128/mcb.24.6.2308-2317.2004.

Ekerot, M. *et al.* (2008) 'Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter', *The Biochemical Journal*, 412(2), pp. 287–98. doi: 10.1042/BJ20071512.

Emery, C. M. *et al.* (2009) 'MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), pp. 20411–20416. doi: 10.1073/pnas.0905833106.

English, J. M. *et al.* (1998) 'Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(7), pp. 3854–60. doi: 10.1074/jbc.273.7.3854.

English, J. M. *et al.* (1999) 'Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(44), pp. 31588–92. doi: 10.1074/jbc.274.44.31588.

Esparis-Ogando, A. *et al.* (2002) 'Erk5 Participates in Neuregulin Signal Transduction and Is Constitutively Active in Breast Cancer Cells Overexpressing ErbB2', *Molecular and Cellular Biology*, 22(1), pp. 270–285. doi: 10.1128/mcb.22.1.270-285.2002.

F

Fabian, J. R. *et al.* (1994) 'A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), pp. 5982–5986. doi: 10.1073/pnas.91.13.5982.

Falchook, G. S. *et al.* (2012) 'Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial', *The Lancet Oncology*, 13(8), pp. 782–9. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70269-3.

Fattore, L. *et al.* (2016) 'miR-579-3p controls melanoma progression and resistance to target therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), pp. E5005–E5013. doi: 10.1073/pnas.1607753113.

- Fattore, L. *et al.* (2017) 'MicroRNAs in melanoma development and resistance to target therapy', *Oncotarget*, pp. 22262–22278. doi: 10.18632/oncotarget.14763.
- Fedorenko, I. V. *et al.* (2015) 'BRAF inhibition generates a host-tumor niche that mediates therapeutic escape', *Journal of Investigative Dermatology*, 135(12), pp. 3115–3124. doi: 10.1038/jid.2015.329.
- Felicetti, F. *et al.* (2008) 'The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms', *Cancer Research*, 68(8), pp. 2745–2754. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2538.
- Felicetti, F. *et al.* (2016) 'Exosome-mediated transfer of miR-222 is sufficient to increase tumor malignancy in melanoma', *Journal of Translational Medicine*, 14(1), p.56 doi: 10.1186/s12967-016-0811-2.
- Fernandez, M. R., Henry, M. D. y Lewis, R. E. (2012) 'Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2) Regulates Tumor Cell Transformation via AMPK', *Molecular and Cellular Biology*, 32(18), pp. 3718–3731. doi: 10.1128/mcb.06754-11.
- Ferrell, J. E. y Bhatt, R. R. (1997) 'Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), pp. 19008–19016. doi: 10.1074/jbc.272.30.19008.
- Finegan, K. G. *et al.* (2009) 'Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5', *Cell Death and Differentiation*, 16(5), pp. 674–683. doi: 10.1038/cdd.2008.193.
- Flaherty, K. T. *et al.* (2010) 'Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma', *New England Journal of Medicine*, 363(9), pp. 809–819. doi: 10.1056/NEJMoa1002011.
- Flaherty, K. T., Infante, J. R., *et al.* (2012) 'Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations', *New England Journal of Medicine*, 367(18), pp. 1694–1703. doi: 10.1056/NEJMoa1210093.
- Flaherty, K. T., Robert, C., *et al.* (2012) 'Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma', *New England Journal of Medicine*, 367(2), pp. 107–114. doi: 10.1056/NEJMoa1203421.
- Fofaria, N. M. *et al.* (2015) 'Overexpression of Mcl-1 confers resistance to BRAFV600E inhibitors alone and in combination with MEK1/2 inhibitors in melanoma', *Oncotarget*, 6(38), pp. 40535–40556. doi: 10.18632/oncotarget.5755.
- Fogh, J., Fogh, J. M. y Orfeo, T. (1977) 'One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice', *Journal of the National Cancer Institute*, pp. 221–226. doi: 10.1093/jnci/59.1.221.
- Fraser, C. *et al.* (2016) 'Rapid Discovery and Structure-Activity Relationships of Pyrazolopyrimidines That Potently Suppress Breast Cancer Cell Growth via SRC Kinase Inhibition with Exceptional Selectivity over ABL Kinase', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(10), pp. 4697–710. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00065.
- Frederick, D. T. *et al.* (2013) 'BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma', *Clinical Cancer Research*, 19(5), pp. 1225–1231. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1630.

Freeman, A. K., Ritt, D. A. y Morrison, D. K. (2013) 'Effects of Raf Dimerization and Its Inhibition on Normal and Disease-Associated Raf Signaling', *Molecular Cell*, 49(4), pp. 751–758. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.018.

Friedman, R. C. *et al.* (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Research*, 19(1), pp. 92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108.

Frodyma, D. *et al.* (2017) 'Coordinating ERK signaling via the molecular scaffold Kinase Suppressor of Ras', *F1000Research*, 6, p. 1621. doi: 10.12688/f1000research.11895.1.

Fruman, D. A. y Rommel, C. (2014) 'PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities', *Nature Reviews Drug discovery*, 13(2), pp. 140–56. doi: 10.1038/nrd4204.

Fukuhara, S. *et al.* (2000) 'Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves G α_q and G $\alpha_{12/13}$ families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway.', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), pp. 21730–6. doi: 10.1074/jbc.M002410200.

G

Gallagher, S. J. *et al.* (2013) 'Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis.', *Oncogene*, 32(17), pp. 2230–8. doi: 10.1038/onc.2012.229.

Garraway, L. A. *et al.* (2005) 'Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma', *Nature*, 436(7047), pp. 117–122. doi: 10.1038/nature03664.

Gebert, L. F. R. y MacRae, I. J. (2019) 'Regulation of microRNA function in animals.', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), pp. 21–37. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7.

Gembarska, A. *et al.* (2012) 'MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma', *Nature Medicine*, 18(8), pp. 1239–1247. doi: 10.1038/nm.2863.

Germann, U. A. *et al.* (2017) 'Targeting the MAPK signaling pathway in cancer: Promising preclinical activity with the novel selective ERK1/2 inhibitor BVD-523 (ulixertinib)', *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(11), pp. 2351–2363. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0456.

Gewinner, C. *et al.* (2009) 'Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling', *Cancer Cell*, 16(2), pp. 115–25. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.006.

Ghoussaini, M. *et al.* (2014) 'Evidence that breast cancer risk at the 2q35 locus is mediated through IGFBP5 regulation', *Nature Communications*, 4, p. 4999. doi: 10.1038/ncomms5999.

Giard, D. J. *et al.* (1973) 'In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors', *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5): 1417–1423. doi: 10.1093/jnci/51.5.1417

Gilmartin, A. G. *et al.* (2011) 'GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition', *Clinical Cancer Research*, 17(5), pp. 989–1000. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2200.

Girotti, M. R. *et al.* (2013) 'Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma', *Cancer Discovery*, 3(2), pp. 158–167.

doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0386.

Girotti, M. R. *et al.* (2015) 'Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma', *Cancer Cell*, 27(1), pp. 85–96. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.006.

Goel, V. K. *et al.* (2006) 'Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma', *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), pp. 154–60. doi: 10.1038/sj.jid.5700026.

Goetz, E. M. *et al.* (2014) 'ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors', *Cancer Research*, 74(23), pp. 7079–89. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2073.

Golan, T. *et al.* (2019) 'Adipocytes sensitize melanoma cells to environmental TGF- β cues by repressing the expression of miR-211', *Science Signaling*, 12(591). doi: 10.1126/scisignal.aav6847.

Goncalves, M. D., Hopkins, B. D. y Cantley, L. C. (2018) 'Phosphatidylinositol 3-kinase, growth disorders, and cancer', *New England Journal of Medicine*, 379(21), pp. 2052–2062. doi: 10.1056/NEJMra1704560.

Gopal, Y. N. V. *et al.* (2014) 'Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1 α and oxidative phosphorylation in melanoma', *Cancer Research*, 74(23), pp. 7037–47. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1392.

Gorgoulis, V. G. *et al.* (2005) 'Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions', *Nature*, 434(7035), pp. 907–913. doi: 10.1038/nature03485.

Gowrishankar, K. *et al.* (2012) 'Acquired resistance to BRAF inhibition can confer cross-resistance to combined BRAF/MEK inhibition', *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(7), pp. 1850–9. doi: 10.1038/jid.2012.63.

Green, T. P. *et al.* (2009) 'Preclinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530', *Molecular Oncology*, 3(3), pp. 248–61. doi: 10.1016/j.molonc.2009.01.002.

Greger, J. G. *et al.* (2012) 'Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations', *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(4), pp. 909–20. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0989.

Griewank, K. G. *et al.* (2014) 'TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma', *Journal of the National Cancer Institute*, 106(9). doi: 10.1093/jnci/dju246.

Gupta, P. B. *et al.* (2005) 'The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation', *Nature Genetics*, 37(10), pp. 1047–1054. doi: 10.1038/ng1634.

Gupta, S. *et al.* (2007) 'Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110 α Is Required for Ras-Driven Tumorigenesis in Mice', *Cell*, 129(5), pp. 957–968. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.051.

H

Ha, M. y Kim, V. N. (2014) 'Regulation of microRNA biogenesis', *Nature Reviews Molecular*

Cell Biology, 15(8), pp. 509–524. doi: 10.1038/nrm3838.

Haglund, K. y Dikic, I. (2012) 'The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting', *Journal of Cell Science*, 125(Pt 2), pp. 265–75. doi: 10.1242/jcs.091280.

Haling, J. R. *et al.* (2014) 'Structure of the BRAF-MEK complex reveals a kinase activity independent role for BRAF in MAPK signaling', *Cancer Cell*, 26(3), pp. 402–413. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.007.

Hall, D. P. *et al.* (2014) 'TRPM3 and miR-204 Establish a Regulatory Circuit that Controls Oncogenic Autophagy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma', *Cancer Cell*, 26(5), pp. 738–753. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.015.

Hanafusa, H. *et al.* (2002) 'Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway', *Nature Cell Biology*, 4(11), pp. 850–858. doi: 10.1038/ncb867.

Hanna, J., Hossain, G. S. y Kocerha, J. (2019) 'The potential for microRNA therapeutics and clinical research', *Frontiers in Genetics*, 10(MAY), p. 478. doi: 10.3389/fgene.2019.00478.

Haq, R. *et al.* (2013) 'Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF', *Cancer Cell*, 23(3), pp. 302–315. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.003.

Hari, S. B., Merritt, E. A. y Maly, D. J. (2013) 'Sequence determinants of a specific inactive protein kinase conformation', *Chemistry & Biology*, 20(6), pp. 806–15. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.05.005.

Hatzivassiliou, G. *et al.* (2010) 'RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth', *Nature*, 464(7287), pp. 431–435. doi: 10.1038/nature08833.

Hatzivassiliou, G. *et al.* (2013) 'Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers', *Nature*, 501(7466), pp. 232–236. doi: 10.1038/nature12441.

Hauschild, A. *et al.* (2012) 'Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial', *The Lancet*, 380(9839), pp. 358–365. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X.

Haydn, J. M. *et al.* (2014) 'The MAPK pathway as an apoptosis enhancer in melanoma', *Oncotarget*, 5(13), pp. 5040–53. doi: 10.18632/oncotarget.2079.

Hayward, N. K. *et al.* (2017) 'Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes', *Nature*, 545(7653), pp. 175–180. doi: 10.1038/nature22071.

Heidorn, S. J. *et al.* (2010) 'Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF', *Cell*, 140(2), pp. 209–221. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.040.

Hernandez-Sanchez, C. *et al.* (1995) 'The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor- I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), pp. 29176–29181. doi: 10.1074/jbc.270.49.29176.

Herrera-Abreu, M. T. *et al.* (2016) 'Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer', *Cancer Research*, 76(8), pp. 2301–2313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0728.

- Hirata, E. *et al.* (2015) 'Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin β 1/FAK Signaling', *Cancer Cell*, 27(4), pp. 574–588. doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.008.
- Hoang, V. T. *et al.* (2017) 'Oncogenic signaling of MEK5-ERK5', *Cancer Letters*, 392, pp. 51–59. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.034.
- Hocker, T. y Tsao, H. (2007) 'Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants', *Human Mutation*, 28(6), pp.578-588. doi: 10.1002/humu.20481.
- Hodis, E. *et al.* (2012) 'A landscape of driver mutations in melanoma', *Cell*, 150(2), pp. 251–263. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024.
- Hollenhorst, P. C. *et al.* (2011) 'Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells', *Genes & Development*, 25(20), pp. 2147–2157. doi: 10.1101/gad.17546311.
- Hong, A. *et al.* (2018) 'Exploiting drug addiction mechanisms to select against mapki-resistant melanoma', *Cancer Discovery*, 8(1), pp. 74–93. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0682.
- Horn, S. *et al.* (2013) 'TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma', *Science*, 339(6122), pp. 959–961. doi: 10.1126/science.1230062.
- Hou, X. *et al.* (2011) 'A new role of NUA1: Directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation', *Oncogene*, 30(26), pp. 2933–2942. doi: 10.1038/onc.2011.19.
- Hu-Lieskovan, S. *et al.* (2015) 'Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma', *Science Translational Medicine*, 7(279), p. 279ra41. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4691.
- Hu, J. *et al.* (2013) 'Allosteric activation of functionally asymmetric RAF kinase dimers', *Cell*, 154(5), pp. 1036–1046. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.046.
- Huang, F., Zeng, X. *et al.* (2013) 'Lysine 63-linked polyubiquitination is required for EGF receptor degradation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), pp. 15722–15727. doi: 10.1073/pnas.1308014110.
- Huang, F. W., Hodis, E. *et al.* (2013) 'Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma', *Science*, 339(6122), pp. 957–959. doi: 10.1126/science.1229259.
- Huang, J. y Manning, B. D. (2008) 'The TSC1-TSC2 complex: A molecular switchboard controlling cell growth', *Biochemical Journal*, pp. 179–190. doi: 10.1042/BJ20080281.
- Hugo, W. *et al.* (2015) 'Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance', *Cell*, 162(6), pp. 1271–1285. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.061.
- Humbert, N. *et al.* (2010) 'Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUA1', *The EMBO Journal*, 29(2), pp. 376–386. doi: 10.1038/emboj.2009.342.
- Hwang, J. R. *et al.* (2016) 'The C-terminus of IGFBP-5 suppresses tumor growth by inhibiting angiogenesis', *Scientific Reports*, 6, p. 39334. doi: 10.1038/srep39334.

I

- Iams, W. T. y Lovly, C. M. (2015) 'Molecular pathways: Clinical applications and future direction of insulin-like growth factor-1 receptor pathway blockade', *Clinical Cancer*

Research, 21(19), pp. 4270–4277. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2518.

J

Jagemann, L. R. *et al.* (2008) 'The functional interaction of 14-3-3 proteins with the ERK1/2 scaffold KSR1 occurs in an isoform-specific manner', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), pp. 17450–62. doi: 10.1074/jbc.M709185200.

Jaiswal, B. S. *et al.* (2018) 'ERK Mutations and Amplification Confer Resistance to ERK-Inhibitor Therapy', *Clinical Cancer Research*, 24(16), pp. 4044–4055. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3674.

Jameson, K. L. *et al.* (2013) 'IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors', *Nature Medicine*, 19(5), pp. 626–630. doi: 10.1038/nm.3165.

Jaumot, M. y Hancock, J. F. (2001) 'Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions', *Oncogene*, 20(30), pp. 3949–3958. doi: 10.1038/sj.onc.1204526.

Jha, S. *et al.* (2016) 'Dissecting Therapeutic Resistance to ERK Inhibition', *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(4), pp. 548–59. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0172.

Ji, Z. *et al.* (2015) 'MITF Modulates Therapeutic Resistance through EGFR Signaling', *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(7), pp. 1863–1872. doi: 10.1038/jid.2015.105.

Johannessen, C. M. *et al.* (2010) 'COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation', *Nature*, 468(7326), pp. 968–72. doi: 10.1038/nature09627.

Johannessen, C. M. *et al.* (2013) 'A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition', *Nature*, 504(7478), pp. 138–42. doi: 10.1038/nature12688.

Johnson, D. B. *et al.* (2015) 'Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms', *European Journal of Cancer*, 51(18), pp. 2792–2799. doi: 10.1016/j.ejca.2015.08.022.

Johnson, D. B. *et al.* (2018) 'BRAF internal deletions and resistance to BRAF/MEK inhibitor therapy', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 31(3), pp. 432–436. doi: 10.1111/pcmr.12674.

K

Kamakura, S., Moriguchi, T. y Nishida, E. (1999) 'Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus.', *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), pp. 26563–26571. doi: 10.1074/jbc.274.37.26563.

Kamioka, Y. *et al.* (2010) 'Multiple decisive phosphorylation sites for the negative feedback regulation of SOS1 via ERK', *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), pp. 33540–33548. doi: 10.1074/jbc.M110.135517.

Karlsson, M. *et al.* (2004) 'Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), pp. 41882–91. doi: 10.1074/jbc.M406720200.

Karnoub, A. E. y Weinberg, R. A. (2008) 'Ras oncogenes: split personalities', *Nature Reviews*

Molecular Cell Biology, 9(7), pp. 517–31. doi: 10.1038/nrm2438.

Karoulia, Z. *et al.* (2016) 'An Integrated Model of RAF Inhibitor Action Predicts Inhibitor Activity against Oncogenic BRAF Signaling', *Cancer Cell*, 30(3), pp. 485–498. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.024.

Karoulia, Z., Gavathiotis, E. y Poulikakos, P. I. (2017) 'New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer', *Nature Reviews Cancer*, 17(11), pp. 676–691. doi: 10.1038/nrc.2017.79.

Karras, P. *et al.* (2019) 'p62/SQSTM1 Fuels Melanoma Progression by Opposing mRNA Decay of a Selective Set of Pro-metastatic Factors', *Cancer Cell*, 35(1), pp. 46–63.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2018.11.008.

Kato, Y. (1997) 'BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C', *The EMBO Journal*, 16(23), pp. 7054–7066. doi: 10.1093/emboj/16.23.7054.

Kato, Y. *et al.* (1998) 'Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor', *Nature*, 395(6703), pp. 713–6. doi: 10.1038/27234.

Kaur, A. *et al.* (2016) 'SFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance', *Nature*, 532(7598), pp. 250–254. doi: 10.1038/nature17392.

Kawazoe, T. y Taniguchi, K. (2019) 'The Sprouty/Spred family as tumor suppressors: Coming of age', *Cancer Science*, pp. 1525–1535. doi: 10.1111/cas.13999.

Kidger, A. M. *et al.* (2017) 'Dual-specificity phosphatase 5 controls the localized inhibition, propagation, and transforming potential of ERK signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(3), pp. E317–E326. doi: 10.1073/pnas.1614684114.

Kidger, A. M. *et al.* (2020) 'Dual-Mechanism ERK1/2 Inhibitors Exploit a Distinct Binding Mode to Block Phosphorylation and Nuclear Accumulation of ERK1/2', *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(2), pp. 525–539. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0505.

Kidger, A. M. y Keyse, S. M. (2016) 'The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs)', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 50, pp. 125–32. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.009.

Kidger, A. M., Siphthorp, J. y Cook, S. J. (2018) 'ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway', *Pharmacology and Therapeutics*, pp. 45–60. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.007.

Kim, K. B. *et al.* (2013) 'Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor', *Journal of Clinical Oncology*, 31(4), pp. 482–489. doi: 10.1200/JCO.2012.43.5966.

Kim, M. *et al.* (2006) 'Comparative Oncogenomics Identifies NEDD9 as a Melanoma Metastasis Gene', *Cell*, 125(7), pp. 1269–1281. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.008.

King, A. J. *et al.* (1998) 'The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338', *Nature*, 396(6707), pp. 180–183. doi: 10.1038/24184.

Kirkwood, J. M. *et al.* (1996) 'Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684.', *Journal of*

Clinical Oncology, 14(1), pp. 7–17. doi: 10.1200/JCO.1996.14.1.7.

Kirkwood, J. M. *et al.* (2004) 'A Pooled Analysis of Eastern Cooperative Oncology Group and Intergroup Trials of Adjuvant High-Dose Interferon for Melanoma', *Clinical Cancer Research*, 10(5), pp. 1670–1677. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1103-3.

Knight, D. A. *et al.* (2013) 'Host immunity contributes to the antimelanoma activity of BRAF inhibitors', *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), pp. 1371–1381. doi: 10.1172/JCI66236.

Koelblinger, P. and Dummer, R. (2017) 'Targeted treatment of advanced NRAS-mutated melanoma', *Oncotarget*, pp. 84616–84617. doi: 10.18632/oncotarget.21388.

Koetz-Ploch, L. *et al.* (2017) 'MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 30(3), pp. 328–338. doi: 10.1111/pcmr.12578.

Komatsu, N. *et al.* (2015) 'mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells', *Oncogene*, 34(45), pp. 5607–16. doi: 10.1038/onc.2015.16.

Konieczkowski, D. J. *et al.* (2014) 'A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors', *Cancer Discovery*, 4(7), pp. 816–827. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0424.

Kono, M. *et al.* (2006) 'Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression', *Molecular Cancer Research*, 4(10), pp. 779–92. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0077.

Kortum, R. L. y Lewis, R. E. (2004) 'The Molecular Scaffold KSR1 Regulates the Proliferative and Oncogenic Potential of Cells', *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), pp. 4407–4416. doi: 10.1128/mcb.24.10.4407-4416.2004.

Krauthammer, M. *et al.* (2012) 'Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma', *Nature Genetics*, 44(9), pp. 1006–1014. doi: 10.1038/ng.2359.

Krauthammer, M. *et al.* (2015) 'Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas', *Nature Genetics*, 47(9), pp. 996–1002. doi: 10.1038/ng.3361.

Krepler, C. *et al.* (2016) 'Personalized Preclinical Trials in BRAF Inhibitor-Resistant Patient-Derived Xenograft Models Identify Second-Line Combination Therapies', *Clinical Cancer Research*, 22(7), pp. 1592–602. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1762.

Kucharska, A. *et al.* (2009) 'Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK', *Cellular Signalling*, 21(12), pp. 1794–1805. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.07.015.

Kuilman, T. *et al.* (2008) 'Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network', *Cell*, 133(6), pp. 1019–1031. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.039.

Kulkarni, A. *et al.* (2017) 'BRAF Fusion as a Novel Mechanism of Acquired Resistance to Vemurafenib in BRAFV600E Mutant Melanoma', *Clinical Cancer Research*, 23(18), pp. 5631–5638. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0758.

L

- Lake, D., Corrêa, S. A. L. y Müller, J. (2016) 'Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), pp. 4397–4413. doi: 10.1007/s00018-016-2297-8.
- Lambert, J. M. *et al.* (2002) 'Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism', *Nature Cell Biology*, 4(8), pp. 621–625. doi: 10.1038/ncb833.
- Larkin, J. *et al.* (2014) 'Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma', *New England Journal of Medicine*, 371(20), pp. 1867–1876. doi: 10.1056/NEJMoa1408868.
- Larkin, J. *et al.* (2015) 'Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated Melanoma', *New England Journal of Medicine*, 373(1), pp. 23–34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
- Lassen, A. *et al.* (2014) 'Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma', *Molecular Cancer*, 13(1), p. 83. doi: 10.1186/1476-4598-13-83.
- Lavoie, H. y Therrien, M. (2015) 'Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), pp. 281–298. doi: 10.1038/nrm3979.
- Lawrence, M. S. *et al.* (2014) 'Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types', *Nature*, 505(7484), pp. 495–501. doi: 10.1038/nature12912.
- Lee, J. T. *et al.* (2010) 'PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(6), pp. 820–7. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00763.x.
- Lehr, S. *et al.* (2004) 'Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1', *Biochemistry*, 43(38), pp. 12133–40. doi: 10.1021/bi049753e.
- Lennartsson, J. *et al.* (2010) 'Erk 5 is necessary for sustained PDGF-induced Akt phosphorylation and inhibition of apoptosis', *Cellular Signalling*, 22(6), pp. 955–60. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.020.
- Levchenko, A., Bruck, J. y Sternberg, P. W. (2000) 'Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp. 5818–5823. doi: 10.1073/pnas.97.11.5818.
- Levy, C. *et al.* (2010) 'Intronic miR-211 Assumes the Tumor Suppressive Function of Its Host Gene in Melanoma', *Molecular Cell*, 40(5), pp. 841–849. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.020.
- Li, L. *et al.* (2019) 'EGR1 regulates angiogenic and osteoclastogenic factors in prostate cancer and promotes metastasis', *Oncogene*, 38(35), pp. 6241–6255. doi: 10.1038/s41388-019-0873-8.
- Li, X. *et al.* (2007) 'Expression level of insulin-like growth factor binding protein 5 mRNA is a prognostic factor for breast cancer', *Cancer Science*, 98(10), pp. 1592–1596. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00565.x.
- Li, X. *et al.* (2008) 'ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling', *Cellular Signalling*, 20(11), pp. 2145–2155. doi:

10.1016/j.cellsig.2008.08.006.

Li, X. *et al.* (2011) 'Phosphorylation of caspase-7 by p21-activated protein kinase (PAK) 2 inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis of breast cancer cell lines', *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), pp. 22291–22299. doi: 10.1074/jbc.M111.236596.

Liang, Z. *et al.* (2017) 'SUMOylation of IQGAP1 promotes the development of colorectal cancer', *Cancer Letters*, 411, pp. 90–99. doi: 10.1016/j.canlet.2017.09.046.

Lin, L., Sabnis, A. J. *et al.* (2015) 'The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies', *Nature Genetics*, 47(3), pp. 250–256. doi: 10.1038/ng.3218.

Lin, W. M., Luo, S. *et al.* (2015) 'Outcome of patients with de novo versus nevus-associated melanoma', *Journal of the American Academy of Dermatology*, pp. 54–58. doi: 10.1016/j.jaad.2014.09.028.

Lin, S. y Gregory, R. I. (2015) 'MicroRNA biogenesis pathways in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 15(6), pp. 321–333. doi: 10.1038/nrc3932.

Lindsay, C. R. *et al.* (2011) 'P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis', *Nature Communications*, 2(1), p. 555. doi: 10.1038/ncomms1560.

Lionarons, D. A. *et al.* (2019) 'RAC1P29S Induces a Mesenchymal Phenotypic Switch via Serum Response Factor to Promote Melanoma Development and Therapy Resistance', *Cancer Cell*, 36(1), pp. 68–83.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2019.05.015.

Lito, P. *et al.* (2012) 'Relief of Profound Feedback Inhibition of Mitogenic Signaling by RAF Inhibitors Attenuates Their Activity in BRAFV600E Melanomas', *Cancer Cell*, 22(5), pp. 668–682. doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.009.

Lito, P., Rosen, N. y Solit, D. B. (2013) 'Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors', *Nature Medicine*, 19(11), pp. 1401–1409. doi: 10.1038/nm.3392.

Lito, P. *et al.* (2014) 'Disruption of CRAF-mediated MEK activation is required for effective MEK inhibition in KRAS mutant tumors', *Cancer Cell*, 25(5), pp. 697–710. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.011.

Liu, L. *et al.* (1999) 'Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma', *Nature Genetics*, 21(1), pp. 128–132. doi: 10.1038/5082.

Lizcano, J. M. *et al.* (2004) 'LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1', *The EMBO Journal*, 23(4), pp. 833–843. doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.

Long, G. V. *et al.* (2011) 'Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 29(10), pp. 1239–1246. doi: 10.1200/JCO.2010.32.4327.

Long, G. V., Stroyakovskiy, D. *et al.* (2014) 'Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma', *New England Journal of Medicine*, 371(20), pp. 1877–1888. doi: 10.1056/NEJMoa1406037.

Long, G. V., Fung, C. *et al.* (2014) 'Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma', *Nature Communications*, 5, p. 5694. doi: 10.1038/ncomms6694.

Long, G. V. *et al.* (2015) 'Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: A multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial', *The Lancet*, 386(9992), pp. 444–451. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60898-4.

Long, G. V., Hauschild, A., *et al.* (2017) 'Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma', *New England Journal of Medicine*, 377(19), pp. 1813–1823. doi: 10.1056/NEJMoa1708539.

Long, G. V., Flaherty, K. T., *et al.* (2017) 'Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/ K-mutant melanoma: Long-term survival and safety analysis of a phase 3 study', *Annals of Oncology*, 28(7), pp. 1631–1639. doi: 10.1093/annonc/mdx176.

Long, G. V. *et al.* (2018) 'Long-term outcomes in patients with BRAF V600-mutant metastatic melanoma who received dabrafenib combined with trametinib', *Journal of Clinical Oncology*, 36(7), pp. 667–673. doi: 10.1200/JCO.2017.74.1025.

Longva, K. E. *et al.* (2002) 'Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies', *Journal of Cell Biology*, 156(5), pp. 843–854. doi: 10.1083/jcb.200106056.

Loveridge, C. J. *et al.* (2017) 'Increased T-cell infiltration elicited by Erk5 deletion in a Pten-deficient mouse model of prostate carcinogenesis', *Cancer Research*, 77(12), pp. 3158–3168. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2565.

Lozano, J. *et al.* (2003) 'Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic Ras signaling in mice', *Cancer Research*, 63(14), pp. 4232–4238.

Lu, H. *et al.* (2017) 'PAK signalling drives acquired drug resistance to MAPK inhibitors in BRAF-mutant melanomas', *Nature*, 550(7674), pp. 133–136. doi: 10.1038/nature24040.

Lübbe, J. *et al.* (1994) 'Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma', *Journal of Investigative Dermatology*, 102(5), pp. 819–821. doi: 10.1111/1523-1747.ep12381544.

Lujambio, A. y Lowe, S. W. (2012) 'The microcosmos of cancer', *Nature*, 482(7385), pp. 347–55. doi: 10.1038/nature10888.

M

Ma, L. *et al.* (2005) 'Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis', *Cell*, 121(2), pp. 179–193. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.031.

Ma, X. H. *et al.* (2014) 'Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma', *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), pp. 1406–1417. doi: 10.1172/JCI70454.

Mackenzie Ross, A. D. *et al.* (2013) 'Senescence evasion in melanoma progression: Uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26(2), pp. 226–235. doi: 10.1111/pcmr.12060.

Madtes, D. K. *et al.* (1988) 'Induction of transforming growth factor- α in activated human alveolar macrophages', *Cell*, 53(2), pp. 285–293. doi: 10.1016/0092-8674(88)90390-X.

Maehama, T. y Dixon, J. E. (1998) 'The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate',

- Journal of Biological Chemistry*, 273(22), pp. 13375–13378. doi: 10.1074/jbc.273.22.13375.
- Maertens, O. *et al.* (2013) 'Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis', *Cancer Discovery*, 3(3), pp. 338–49. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0313.
- Malliri, A. *et al.* (2002) 'Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours.', *Nature*, 417(6891), pp. 867–71. doi: 10.1038/nature00848.
- Malumbres, M. *et al.* (2004) 'Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6.', *Cell*, 118(4), pp. 493–504. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.002.
- Malumbres, M. y Barbacid, M. (2009) 'Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm', *Nature Reviews Cancer*, pp. 153–166. doi: 10.1038/nrc2602.
- Mandl, M., Slack, D. N. y Keyse, S. M. (2005) 'Specific Inactivation and Nuclear Anchoring of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 by the Inducible Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP5', *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), pp. 1830–1845. doi: 10.1128/mcb.25.5.1830-1845.2005.
- Mantso, T. *et al.* (2018) 'Hyperthermia induces therapeutic effectiveness and potentiates adjuvant therapy with non-targeted and targeted drugs in an in vitro model of human malignant melanoma', *Scientific Reports*, 8(1), p. 10724. doi: 10.1038/s41598-018-29018-0.
- Mar, V. J. *et al.* (2015) 'The role of BRAF mutations in primary melanoma growth rate and survival', *The British Journal of Dermatology*, 173(1), pp. 76–82. doi: 10.1111/bjd.13756.
- Martin, C. A. *et al.* (2018) 'Palbociclib synergizes with BRAF and MEK inhibitors in treatment naïve melanoma but not after the development of BRAF inhibitor resistance', *International Journal of Cancer*, 142(10), pp. 2139–2152. doi: 10.1002/ijc.31220.
- Martin, J. L. *et al.* (2009) 'Potentiation of growth factor signaling by insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast epithelial cells requires sphingosine kinase activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(38), pp. 25542–52. doi: 10.1074/jbc.M109.007120.
- Martín-Gorgojo, A. y Nagore, E. (2018) 'Melanoma Arising in a Melanocytic Nevus', *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 109(2), pp. 123–132. doi: 10.1016/j.adengl.2017.12.006.
- Matheny, S. A. *et al.* (2004) 'Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP', *Nature*, 427(6971), pp. 256–260. doi: 10.1038/nature02237.
- Matheny, S. A. y White, M. A. (2009) 'Signaling threshold regulation by the Ras effector IMP', *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), pp. 11007–11011. doi: 10.1074/jbc.R800082200.
- McArthur, G. A. *et al.* (2017) 'Vemurafenib in metastatic melanoma patients with brain metastases: an open-label, single-arm, phase 2, multicentre study', *Annals of Oncology*, 28(3), pp. 634–641. doi: 10.1093/annonc/mdw641.
- McKay, M. M., Ritt, D. A. y Morrison, D. K. (2009) 'Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), pp. 11022–7. doi: 10.1073/pnas.0901590106.
- McKee, C. S. *et al.* (2013) 'Oncogenic BRAF signalling increases Mcl-1 expression in cutaneous metastatic melanoma', *Experimental Dermatology*, 22(11), pp. 767–9. doi:

10.1111/exd.12254.

Meloche, S. y Pouysségur, J. (2007) 'The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition', *Oncogene*, 26(22), pp. 3227–3239. doi: 10.1038/sj.onc.1210414.

Mendoza, M. C., Er, E. E. y Blenis, J. (2011) 'The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation', *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), pp. 320–328. doi: 10.1016/j.tibs.2011.03.006.

Menzies, A. M. y Long, G. V. (2014) 'Systemic treatment for BRAF-mutant melanoma: Where do we go next?', *The Lancet Oncology*, 15(9), pp. e371–81. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70072-5.

Miao, B. *et al.* (2015) 'EPHA2 is a mediator of vemurafenib resistance and a novel therapeutic target in melanoma', *Cancer Discovery*, 5(3), pp. 274–287. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0295.

Michaloglou, C. *et al.* (2005) 'BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi', *Nature*, 436(7051), pp. 720–4. doi: 10.1038/nature03890.

Miller, A. J. *et al.* (2004) 'Transcriptional Regulation of the Melanoma Prognostic Marker Melastatin (TRPM1) by MITF in Melanocytes and Melanoma', *Cancer Research*, 64(2), pp. 509–516. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2440.

Misek, S. A. *et al.* (2020) 'Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells', *Oncogene*, 39(7), pp. 1466–1483. doi: 10.1038/s41388-019-1074-1.

Mok, S. *et al.* (2015) 'Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor improves antitumor efficacy of BRAF inhibition', *BMC cancer*, 15(1), p. 356. doi: 10.1186/s12885-015-1377-8.

Montagut, C. *et al.* (2008) 'Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma', *Cancer Research*, 68(12), pp. 4853–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6787.

Montero, J. *et al.* (2019) 'Destabilization of NOXA mRNA as a common resistance mechanism to targeted therapies', *Nature Communications*, 10(1), p.5157. doi: 10.1038/s41467-019-12477-y.

Montero, J. C. *et al.* (2009) 'Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target', *PLoS ONE*, 4(5), p. e5565. doi: 10.1371/journal.pone.0005565.

Monteverde, T. *et al.* (2015) 'Evidence of cancer-promoting roles for AMPK and related kinases', *The FEBS Journal*, 282(24), pp. 4658–71. doi: 10.1111/febs.13534.

Moriceau, G. *et al.* (2015) 'Tunable-Combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance Limit the Efficacy of BRAF/MEK Cotargeting but Result in Melanoma Drug Addiction', *Cancer Cell*, 27(2), pp. 240–256. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.018.

Morris, E. J. *et al.* (2013) 'Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors', *Cancer Discovery*, 3(7), pp. 742–750. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0070.

Morrison, P., Takishima, K. y Rosner, M. R. (1993) 'Role of threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C and mitogen-activated protein

- kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 268(21), pp. 15536–15543.
- Moschos, S. J. *et al.* (2018) 'Development of MK-8353, an orally administered ERK1/2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors', *JCI insight*, 3(4), p. e92352. doi: 10.1172/jci.insight.92352.
- Müller, J. *et al.* (2001) 'C-TAK1 Regulates Ras Signaling by Phosphorylating the MAPK Scaffold, KSR1', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 983–993. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00383-5.
- Müller, J. *et al.* (2014) 'Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma', *Nature Communications*, 5, p. 5712. doi: 10.1038/ncomms6712.
- Mulloy, R. *et al.* (2003) 'Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade', *Oncogene*, 22(35), pp. 5387–98. doi: 10.1038/sj.onc.1206839.
- Muñoz-Espín, D. y Serrano, M. (2014) 'Cellular senescence: from physiology to pathology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), pp. 482–496. doi: 10.1038/nrm3823.
- Murakami, T. *et al.* (2002) 'Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells', *Cancer Research*, 62(24), pp. 7328–34.
- Murphy, L. O. *et al.* (2002) 'Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products', *Nature Cell Biology*, 4(8), pp. 556–64. doi: 10.1038/ncb822.
- Muthusamy, V. *et al.* (2006) 'Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma', *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45(5), pp. 447–454. doi: 10.1002/gcc.20310.

N

- Najem, A. *et al.* (2017) 'New drug combination strategies in melanoma: Current status and future directions', *Anticancer Research*, 37(11), pp. 5941–5953. doi: 10.21873/anticancer.12041.
- Nassar, N. *et al.* (1995) 'The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue', *Nature*, 375(6532), pp. 554–60. doi: 10.1038/375554a0.
- Nathanson, K. L. *et al.* (2013) 'Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436)', *Clinical Cancer Research*, 19(17), pp. 4868–78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0827.
- Nazarian, R. *et al.* (2010) 'Melanomas acquire resistance to B-Raf(V600E) inhibition by Rtk or N-Ras upregulation', *Nature*, 468(7326), pp. 973–977. doi: 10.1038/nature09626.
- Neuzillet, Y. *et al.* (2017) 'IGF1R activation and the in vitro antiproliferative efficacy of IGF1R inhibitor are inversely correlated with IGFBP5 expression in bladder cancer', *BMC Cancer*, 17(1), p. 636. doi: 10.1186/s12885-017-3618-5.
- Newell, F. *et al.* (2019) 'Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets', *Nature Communications*, 10(1), p. 3163. doi: 10.1038/s41467-019-11107-x.
- Ngiow, S. F. *et al.* (2016) 'Co-inhibition of colony stimulating factor-1 receptor and BRAF oncogene in mouse models of BRAFV600E melanoma', *Oncoimmunology*, 5(3), p. e1089381. doi: 10.1080/2162402X.2015.1089381.
- Niessner, H. *et al.* (2017) 'BRAF inhibitors amplify the proapoptotic activity of MEK

inhibitors by inducing ER stress in NRAS-mutant melanoma', *Clinical Cancer Research*, 23(20), pp. 6203–6215. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0098.

Nikolaev, S. I. *et al.* (2012) 'Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma', *Nature Genetics*, 44(2), pp. 133–139. doi: 10.1038/ng.1026.

Nissan, M. H. *et al.* (2014) 'Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence', *Cancer Research*, 74(8), pp. 2340–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2625.

Nithianandarajah-Jones, G. N. *et al.* (2012) 'ERK5: structure, regulation and function', *Cellular Signalling*, 24(11), pp. 2187–96. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.07.007.

Nogueira, C. *et al.* (2010) 'Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis', *Oncogene*, 29(47), pp. 6222–32. doi: 10.1038/onc.2010.349.

O

O'Donnell, A., Odrowaz, Z. y Sharrocks, A. D. (2012) 'Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know?', *Biochemical Society Transactions*, 40(1), pp. 58–66. doi: 10.1042/BST20110636.

Obara, Y. y Nakahata, N. (2010) 'The signaling pathway leading to extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation via G-proteins and ERK5-dependent neurotrophic effects', *Molecular Pharmacology*, 77(1), pp. 10–16. doi: 10.1124/mol.109.060236.

Obenauf, A. C. *et al.* (2015) 'Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression', *Nature*, 520(7547), pp. 368–372. doi: 10.1038/nature14336.

Oberholzer, P. A. *et al.* (2012) 'RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors', *Journal of Clinical Oncology*, 30(3), pp. 316–321. doi: 10.1200/JCO.2011.36.7680.

Olanich, M. E. *et al.* (2015) 'CDK4 amplification reduces sensitivity to CDK4/6 inhibition in fusion-positive rhabdomyosarcoma', *Clinical Cancer Research*, 21(21), pp. 4947–4959. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2955.

Ong, C. C. *et al.* (2013) 'P21-activated kinase 1 (PAK1) as a therapeutic target in BRAF wild-type melanoma', *Journal of the National Cancer Institute*, 105(9), pp. 606–615. doi: 10.1093/jnci/djt054.

Orgaz, J. L. *et al.* (2020) 'Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance', *Cancer Cell*, 37(1), pp. 85–103.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.003.

Ory, S. *et al.* (2003) 'Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites', *Current Biology*, 13(16), pp. 1356–1364. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00535-9.

Otto, T. y Sicinski, P. (2017) 'Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 17(2), pp. 93–115. doi: 10.1038/nrc.2016.138.

P

Paluncic, J. *et al.* (2016) 'Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(4), pp. 770–784. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.025.

- Pan, C.-W. *et al.* (2017) 'AKT-phosphorylated FOXO1 suppresses ERK activation and chemoresistance by disrupting IQGAP1-MAPK interaction', *The EMBO Journal*, 36(8), pp. 995–1010. doi: 10.15252/emboj.201695534.
- Pandiani, C. *et al.* (2017) 'Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities', *Genes & Development*, 31(8), pp. 724–743. doi: 10.1101/gad.296962.117.
- Paraiso, K. H. T. *et al.* (2011) 'PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression', *Cancer Research*, 71(7), pp. 2750–2760. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2954.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R. y Schwartz, M. A. (2010) 'Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), pp. 633–643. doi: 10.1038/nrm2957.
- Pencheva, N. *et al.* (2014) 'Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation', *Cell*, 156(5), pp. 986–1001. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.038.
- Pereira, D. M. *et al.* (2016) 'MEK5/ERK5 signaling inhibition increases colon cancer cell sensitivity to 5-fluorouracil through a p53-dependent mechanism', *Oncotarget*, 7(23), pp. 34322–40. doi: 10.18632/oncotarget.9107.
- Pereira, D. M. y Rodrigues, C. M. P. (2020) 'Targeted Avenues for Cancer Treatment: The MEK5–ERK5 Signaling Pathway', *Trends in Molecular Medicine*, 26(4), pp. 394–407. doi: 10.1016/j.molmed.2020.01.006.
- Perez-Madrigal, D. *et al.* (2012) 'The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs)', *Cellular Signalling*, 24(12), pp. 2360–8. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.08.001.
- Ploner, C., Kofler, R. y Villunger, A. (2008) 'Noxa: At the tip of the balance between life and death', *Oncogene*, 27(SUPPL1), pp. S84–S92. doi: 10.1038/onc.2009.46.
- Poulikakos, P. I. *et al.* (2010) 'RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF', *Nature*, 464(7287), pp. 427–430. doi: 10.1038/nature08902.
- Poulikakos, P. I. *et al.* (2011) 'RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)', *Nature*, 480(7377), pp. 387–390. doi: 10.1038/nature10662.
- Poynter, J. N. *et al.* (2006) 'BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi', *Melanoma Research*, 16(4), pp. 267–273. doi: 10.1097/01.cmr.0000222600.73179.f3.
- Prahalad, A. *et al.* (2012) 'Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR', *Nature*, 483(7387), pp. 100–104. doi: 10.1038/nature10868.
- Pratilas, C. A. *et al.* (2009) '(V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), pp. 4519–24. doi: 10.1073/pnas.0900780106.

R

- Radu, M. *et al.* (2014) 'PAK signalling during the development and progression of cancer',

Nature Reviews Cancer, 14(1), pp. 13–25. doi: 10.1038/nrc3645.

Radu, M. *et al.* (2015) 'p21-Activated Kinase 2 Regulates Endothelial Development and Function through the Bmk1/Erk5 Pathway', *Molecular and Cellular Biology*, 35(23), pp. 3990–4005. doi: 10.1128/mcb.00630-15.

Rajakulendran, T. *et al.* (2009) 'A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation', *Nature*, 461(7263), pp. 542–5. doi: 10.1038/nature08314.

Rajkumar, S. y Watson, I. R. (2016) 'Molecular characterisation of cutaneous melanoma: Creating a framework for targeted and immune therapies', *British Journal of Cancer*, 115(2), pp. 145–155. doi: 10.1038/bjc.2016.195.

Raman, M., Chen, W. y Cobb, M. H. (2007) 'Differential regulation and properties of MAPKs', *Oncogene*, pp. 3100–3112. doi: 10.1038/sj.onc.1210392.

Ramos-Nino, M. E. *et al.* (2008) 'HGF mediates cell proliferation of human mesothelioma cells through a PI3K/MEK5/Fra-1 pathway', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(2), pp. 209–17. doi: 10.1165/rcmb.2007-0206OC.

Rane, C. K. y Minden, A. (2019) 'P21 activated kinase signaling in cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 54, pp. 40–49. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.006.

Rappolee, D. A. *et al.* (1988) 'Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping', *Science*, 241(4866), pp. 708–12. doi: 10.1126/science.3041594.

Reuveni, H. *et al.* (2013) 'Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment', *Cancer Research*, 73(14), pp. 4383–94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3385.

Ribas, A. *et al.* (2019) 'Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma', *Nature Medicine*, 25(6), pp. 936–940. doi: 10.1038/s41591-019-0476-5.

Richtig, G. *et al.* (2017) 'Beyond the BRAFV600E hotspot: biology and clinical implications of rare BRAF gene mutations in melanoma patients', *British Journal of Dermatology*, 177(4), pp. 936–944. doi: 10.1111/bjd.15436.

Ritt, D. A. *et al.* (2007) 'CK2 Is a Component of the KSR1 Scaffold Complex that Contributes to Raf Kinase Activation', *Current Biology*, 17(2), pp. 179–184. doi: 10.1016/j.cub.2006.11.061.

Ritt, D. A. *et al.* (2010) 'Impact of Feedback Phosphorylation and Raf Heterodimerization on Normal and Mutant B-Raf Signaling', *Molecular and Cellular Biology*, 30(3), pp. 806–819. doi: 10.1128/mcb.00569-09.

Rizos, H. *et al.* (2014) 'BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: Spectrum and clinical impact', *Clinical Cancer Research*, 20(7), pp. 1965–1977. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3122.

Robert, C. *et al.* (2015) 'Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib', *New England Journal of Medicine*, 372(1), pp. 30–39. doi: 10.1056/NEJMoa1412690.

Roberts, O. L. *et al.* (2010) 'ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells', *Journal of Cell Science*, 123(18), pp. 3189–3200. doi: 10.1242/jcs.072801.

- Rommel, C. *et al.* (1996) 'Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1', *Oncogene*, 12(3), pp. 609–619.
- Röring, M. *et al.* (2012) 'Distinct requirement for an intact dimer interface in wild-type, V600E and kinase-dead B-Raf signalling', *The EMBO Journal*, 31(11), pp. 2629–2647. doi: 10.1038/emboj.2012.100.
- Roskoski, R. (2012) 'ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation', *Pharmacological Research*, 66(2), pp. 105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- Roskoski, R. (2015) 'Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors', *Pharmacological Research*, 94, pp. 9–25. doi: 10.1016/j.phrs.2015.01.003.
- Roskoski, R. (2017) 'Allosteric MEK1/2 inhibitors including cobimetanib and trametinib in the treatment of cutaneous melanomas', *Pharmacological Research*, 117, pp. 20–31. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.009.
- Roskoski, R. (2019) 'Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers', *Pharmacological Research*, 142, pp. 151–168. doi: 10.1016/j.phrs.2019.01.039.
- Roux, P. P. *et al.* (2007) 'RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), pp. 14056–14064. doi: 10.1074/jbc.M700906200.
- Rovida, E. *et al.* (2008) 'ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells', *Journal of Hepatology*, 48(1), pp. 107–115. doi: 10.1016/j.jhep.2007.08.010.
- Roy, S. *et al.* (1997) 'Activity of plasma membrane-recruited Raf-1 is regulated by Ras via the Raf zinc finger', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(32), pp. 20139–45. doi: 10.1074/jbc.272.32.20139.
- Rushworth, L. K. *et al.* (2006) 'Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization', *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), pp. 2262–2272. doi: 10.1128/mcb.26.6.2262-2272.2006.

S

- Sabbatino, F. *et al.* (2014) 'PDGFR α up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to BRAF inhibitor resistance in melanoma cells with BRAF mutation', *Oncotarget*, 5(7), pp. 1926–41. doi: 10.18632/oncotarget.1878.
- Saha, M. *et al.* (2012) 'RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation', *The Biochemical Journal*, 447(1), pp. 159–66. doi: 10.1042/BJ20120938.
- Sanborn, J. Z. *et al.* (2015) 'Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), pp. 10995–11000. doi: 10.1073/pnas.1508074112.
- Sander, E. E. *et al.* (1998) 'Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase', *Journal of Cell Biology*, 143(5), pp. 1385–1398. doi: 10.1083/jcb.143.5.1385.
- Sarkisian, S. y Davar, D. (2018) 'MEK inhibitors for the treatment of NRAS mutant melanoma', *Drug Design, Development and Therapy*, 12, pp. 2553–2565. doi:

10.2147/DDDT.S131721.

Sarközi, R. *et al.* (2007) 'ERK1/2-driven and MKP-mediated inhibition of EGF-induced ERK5 signaling in human proximal tubular cells', *Journal of Cellular Physiology*, 211(1), pp. 88–100. doi: 10.1002/jcp.20909.

Sasaki, A. *et al.* (2003) 'Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1', *Nature Cell Biology*, 5(5), pp. 427–432. doi: 10.1038/ncb978.

Sato, K. *et al.* (2013) 'Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation', *Cancer Science*, 104(10), pp. 1315–1322. doi: 10.1111/cas.12225.

Satyamoorthy, K. *et al.* (2001) 'Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and β -catenin pathways', *Cancer Research*, 61(19), pp. 7318–7324.

Satyanarayana, A. y Kaldis, P. (2009) 'Mammalian cell-cycle regulation: Several cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms', *Oncogene*, 28(33), pp. 2925–2939. doi: 10.1038/onc.2009.170.

Saxton, R. A. y Sabatini, D. M. (2017) 'mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease', *Cell*, 168(6), pp. 960–976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.

Schadendorf, D. *et al.* (2015) 'Melanoma', *Nature Reviews Disease Primers*, 1(April), pp. 1–20. doi: 10.1038/nrdp.2015.3.

Schaller, M. D. (2010) 'Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions', *Journal of Cell Science*, 123(7), pp. 1007–1013. doi: 10.1242/jcs.045112.

Schultz, J. *et al.* (2008) 'MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth', *Cell Research*, 18(5), pp. 549–557. doi: 10.1038/cr.2008.45.

Segura, M. F. *et al.* (2009) 'Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), pp. 1814–1819. doi: 10.1073/pnas.0808263106.

Shah, M. Y. *et al.* (2016) 'microRNA Therapeutics in Cancer — An Emerging Concept', *EBioMedicine*, 12, pp. 34–42. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.017.

Shaham, O. *et al.* (2013) 'Pax6 Regulates Gene Expression in the Vertebrate Lens through miR-204', *PLoS Genetics*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1003357.

Shain, A. H. *et al.* (2015) 'The genetic evolution of melanoma from precursor lesions', *New England Journal of Medicine*, 373(20), pp. 1926–1936. doi: 10.1056/NEJMoa1502583.

Shain, A. H. *et al.* (2018) 'Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution', *Cancer Cell*, 34(1), pp. 45–55.e4. doi: 10.1016/j.ccell.2018.06.005.

Shain, A. H. y Bastian, B. C. (2016) 'From melanocytes to melanomas', *Nature Reviews Cancer*, 16(6), pp. 345–358. doi: 10.1038/nrc.2016.37.

Sheppard, K. E. y McArthur, G. A. (2013) 'The cell-cycle regulator CDK4: An emerging

- therapeutic target in melanoma', *Clinical Cancer Research*, 19(19), pp. 5320–5328. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0259.
- Shi, H. *et al.* (2011) 'Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition', *Cancer Research*, 71(15), pp. 5067–5074. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0140.
- Shi, H. *et al.* (2012) 'Melanoma whole-exome sequencing identifies V600E B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance', *Nature Communications*, 3, p. 724. doi: 10.1038/ncomms1727.
- Shi, H., Hong, A., *et al.* (2014) 'A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition', *Cancer Discovery*, 4(1), pp. 69–79. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0279.
- Shi, H., Hugo, W., *et al.* (2014) 'Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy', *Cancer Discovery*, 4(1), pp. 80–93. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0642.
- Shi, L., Zhang, B. *et al.* (2014) 'MiR-204 inhibits human NSCLC metastasis through suppression of NUA1', *British Journal of Cancer*, 111(12), pp. 2316–27. doi: 10.1038/bjc.2014.580.
- Shiroyama, W. *et al.* (2011) 'Docking protein gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-met signaling', *Circulation Research*, 108(6), pp. 664–675. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.232223.
- Shtivelman, E. *et al.* (2014) 'Pathways and therapeutic targets in melanoma', *Oncotarget*, 5(7), pp. 1701–1752. doi: 10.18632/oncotarget.1892.
- Shukla, A. *et al.* (2013) 'Extracellular signal-regulated kinase 5: a potential therapeutic target for malignant mesotheliomas', *Clinical Cancer Research*, 19(8), pp. 2071–83. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3202.
- Shull, A. Y. *et al.* (2012) 'Novel Somatic Mutations to PI3K Pathway Genes in Metastatic Melanoma', *PLoS ONE*, 7(8), p. e43369. doi: 10.1371/journal.pone.0043369.
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V y McCormick, F. (2017) 'RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease', *Cell*, 170(1), pp. 17–33. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.009.
- Simões, A. E. S., Rodrigues, C. M. P. y Borralho, P. M. (2016) 'The MEK5/ERK5 signalling pathway in cancer: a promising novel therapeutic target', *Drug Discovery Today*, 21(10), pp. 1654–1663. doi: 10.1016/j.drudis.2016.06.010.
- Simon, S. *et al.* (2013) 'DOG1 regulates growth and IGFBP5 in gastrointestinal stromal tumors', *Cancer Research*, 73(12), pp. 3661–70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3839.
- Smalley, K. S. M. *et al.* (2008) 'Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), pp. 2876–2883. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0431.
- Søndergaard, J. N. *et al.* (2010) 'Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032', *Journal of Translational Medicine*, 8, p. 39. doi: 10.1186/1479-5876-8-39.
- Sosman, J. A. *et al.* (2012) 'Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib', *New England Journal of Medicine*, 366(8), pp. 707–714. doi:

10.1056/NEJMoa1112302.

Stark, M. S. *et al.* (2015) 'miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma', *Oncotarget*, 6(19), pp. 17753–63. doi: 10.18632/oncotarget.3924.

Steinberg, S. M. *et al.* (2014) 'BRAF inhibition alleviates immune suppression in murine autochthonous melanoma', *Cancer Immunology Research*, 2(11), pp. 1044–50. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0074.

Stevens, P. D. *et al.* (2018) 'Erbin suppresses KSR1-mediated Ras/RAF signaling and tumorigenesis in colorectal cancer', *Cancer Research*, 78(17), pp. 4839–4852. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3629.

Stowe, I. B. *et al.* (2012) 'A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1', *Genes & Development*, 26(13), pp. 1421–6. doi: 10.1101/gad.190876.112.

Straussman, R. *et al.* (2012) 'Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion', *Nature*, 487(7408), pp. 500–504. doi: 10.1038/nature11183.

Strub, T. *et al.* (2018) 'SIRT6 haploinsufficiency induces BRAFV600E melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling', *Nature Communications*, 9(1), p. 3440. doi: 10.1038/s41467-018-05966-z.

Su, F., Viros, A., *et al.* (2012) 'RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors', *New England Journal of Medicine*, 366(3), pp. 207–215. doi: 10.1056/NEJMoa1105358.

Su, F., Bradley, W. D., *et al.* (2012) 'Resistance to selective BRAF inhibition can be mediated by modest upstream pathway activation', *Cancer Research*, 72(4), pp. 969–978. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1875.

Sullivan, R. J. *et al.* (2018) 'First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study', *Cancer Discovery*, 8(2), pp. 184–195. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1119.

Sun, C. *et al.* (2014) 'Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma', *Nature*, 508(1), pp. 118–122. doi: 10.1038/nature13121.

Sun, C., Mezzadra, R. y Schumacher, T. N. (2018) 'Regulation and function of the PD-L1 checkpoint', *Immunity*, 48(3), pp. 434–452. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.014.

Sun, X. *et al.* (2013) 'The regulation and function of the NIAK family', *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(2), pp. R15–22. doi: 10.1530/JME-13-0063.

Sun, X. *et al.* (2016) 'miR-7 reverses the resistance to BRAFi in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways', *Oncotarget*, 7(33), pp. 53558–53570. doi: 10.18632/oncotarget.10669.

Sweetlove, M. *et al.* (2015) 'Inhibitors of pan-PI3K signaling synergize with BRAF or MEK inhibitors to prevent BRAF-mutant melanoma cell growth', *Frontiers in Oncology*, 5(JUN), p. 135. doi: 10.3389/fonc.2015.00135.

T

- Takishima, K. *et al.* (1991) 'Epidermal growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated "MAP" kinase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), pp. 2520–4. doi: 10.1073/pnas.88.6.2520.
- Tanno, B. *et al.* (2005) 'Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells', *Cell Death and Differentiation*, 12(3), pp. 213–23. doi: 10.1038/sj.cdd.4401546.
- Tapial Martínez, P., López Navajas, P. y Lietha, D. (2020) 'FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions', *Biomolecules*, 10(2), p. 179. doi: 10.3390/biom10020179.
- Das Thakur, M. *et al.* (2013) 'Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance', *Nature*, 494(7436), pp. 251–255. doi: 10.1038/nature11814.
- Thevakumaran, N. *et al.* (2015) 'Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation', *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), pp. 37–43. doi: 10.1038/nsmb.2924.
- Thunell, L. K. *et al.* (2014) 'MDM2 SNP309 promoter polymorphism confers risk for hereditary melanoma', *Melanoma Research*, 24(3), pp. 190–197. doi: 10.1097/CMR.0000000000000063.
- Tian, T. *et al.* (2007) 'Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction', *Nature Cell Biology*, 9(8), pp. 905–14. doi: 10.1038/ncb1615.
- Tirosh, I. *et al.* (2016) 'Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq', *Science*, 352(6282), pp. 189–196. doi: 10.1126/science.aad0501.
- Tran, N. H. y Frost, J. A. (2003) 'Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp. 11221–6. doi: 10.1074/jbc.M210318200.
- Trunzer, K. *et al.* (2013) 'Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 31(14), pp. 1767–74. doi: 10.1200/JCO.2012.44.7888.
- Tsai, J. *et al.* (2008) 'Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp. 3041–6. doi: 10.1073/pnas.0711741105.
- Tsao, H. *et al.* (2004) 'Genetic Interaction between NRAS and BRAF Mutations and PTEN/MMAC1 Inactivation in Melanoma', *Journal of Investigative Dermatology*, 122(2), pp. 337–341. doi: 10.1046/j.0022-202X.2004.22243.x.
- Tubita, A. *et al.* (2020) 'Beyond Kinase Activity: ERK5 Nucleo-Cytoplasmic Shuttling as a Novel Target for Anticancer Therapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), p. 938. doi: 10.3390/ijms21030938.
- Tusa, I. *et al.* (2018) 'ERK5 is activated by oncogenic BRAF and promotes melanoma growth', *Oncogene*, 37(19), pp. 2601–2614. doi: 10.1038/s41388-018-0164-9.

U

Umapathy, G. *et al.* (2014) 'The kinase ALK stimulates the kinase ERK5 to promote the expression of the oncogene MYCN in neuroblastoma', *Science Signaling*, 7(349), p. ra102. doi: 10.1126/scisignal.2005470.

Ünal, E. B., Uhlitz, F. y Blüthgen, N. (2017) 'A compendium of ERK targets', *FEBS Letters*, 591(17), pp. 2607–2615. doi: 10.1002/1873-3468.12740.

Untawale, S. *et al.* (1993) 'Transforming growth factor-alpha production and autoinduction in a colorectal carcinoma cell line (DiFi) with an amplified epidermal growth factor receptor gene', *Cancer Research*, 53(7), pp. 1630–6.

V

Varrone, F. y Caputo, E. (2020) 'The miRNAs Role in Melanoma and in Its Resistance to Therapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), p. 878. doi: 10.3390/ijms21030878.

Villanueva, J. *et al.* (2010) 'Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K', *Cancer Cell*, 18(6), pp. 683–695. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.023.

Villanueva, J. *et al.* (2013) 'Concurrent MEK2 Mutation and BRAF Amplification Confer Resistance to BRAF and MEK Inhibitors in Melanoma', *Cell Reports*, 4(6), pp. 1090–1099. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.023.

Vitiello, M. *et al.* (2017) 'Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells', *Oncotarget*, 8(15), pp. 25395–25417. doi: 10.18632/oncotarget.15915.

Vu, H. L. *et al.* (2015) 'RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(5), pp. 590–598. doi: 10.1111/pcmr.12392.

W

Wade, M., Li, Y. C. y Wahl, G. M. (2013) 'MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 13(2), pp. 83–96. doi: 10.1038/nrc3430.

Wagenaar, T. R. *et al.* (2014) 'Resistance to vemurafenib resulting from a novel mutation in the BRAFV600E kinase domain', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(1), pp. 124–33. doi: 10.1111/pcmr.12171.

Wagle, N. *et al.* (2011) 'Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling', *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), pp. 3085–96. doi: 10.1200/JCO.2010.33.2312.

Walter, P. y Ron, D. (2011) 'The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation', *Science*, 334(6059), pp. 1081–6. doi: 10.1126/science.1209038.

Wan, P. T. C. *et al.* (2004) 'Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF', *Cell*, 116(6), pp. 855–867. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00215-6.

Wang, J., Huang, S. K. *et al.* (2015) 'Epigenetic changes of EGFR have an important role in BRAF inhibitor-resistant cutaneous melanomas', *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(2), pp. 532–541. doi: 10.1038/jid.2014.418.

- Wang, J., Sinnberg, T. *et al.* (2015) 'PTEN regulates IGF-1R-mediated therapy resistance in melanoma', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(5), pp. 572–589. doi: 10.1111/pcmr.12390.
- Wang, T., Xiao, M. *et al.* (2015) 'BRAF inhibition stimulates melanoma-associated macrophages to drive tumor growth', *Clinical Cancer Research*, 21(7), pp. 1652–1664. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1554.
- Wang, S., Li, Z. *et al.* (2018) 'NF- κ B-Induced MicroRNA-211 Inhibits Interleukin-10 in Macrophages of Rats with Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(1), pp. 332–342. doi: 10.1159/000486814.
- Wang, W., Lim, K. G. *et al.* (2018) 'KDM6B Counteracts EZH2-Mediated Suppression of IGFBP5 to Confer Resistance to PI3K/AKT Inhibitor Treatment in Breast Cancer.', *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(9), pp. 1973–1983. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0802.
- Watson, I. R. *et al.* (2014) 'The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF', *Cancer Research*, 74(17), pp. 4845–4852. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1232-T.
- Weiss, S. A., Wolchok, J. D. y Sznol, M. (2019) 'Immunotherapy of melanoma: Facts and hopes', *Clinical Cancer Research*, 25(17), pp. 5191–5201. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1550.
- Welch, H. C. E. *et al.* (2002) 'P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and g β y-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac', *Cell*, 108(6), pp. 809–821. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00663-3.
- Welch, H. C. E. (2015) 'Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs', *Small GTPases*, 6(2), pp. 49–70. doi: 10.4161/21541248.2014.973770.
- Wellbrock, C. y Arozarena, I. (2015) 'Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(4), pp. 390–406. doi: 10.1111/pcmr.12370.
- Wendel, H.-G. *et al.* (2007) 'Dissecting eIF4E action in tumorigenesis', *Genes & Development*, 21(24), pp. 3232–7. doi: 10.1101/gad.1604407.
- Whiteman, D. C. *et al.* (2002) 'Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma', *International Journal of Cancer*, 99(1), pp. 63–67. doi: 10.1002/ijc.10294.
- Whittaker, S. R. *et al.* (2013) 'A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition', *Cancer Discovery*, 3(3), pp. 350–62. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0470.
- Wick, M. J. *et al.* (2000) 'Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), pp. 40400–6. doi: 10.1074/jbc.M003937200.
- Widmer, D. S. *et al.* (2012) 'Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(3), pp. 343–353. doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.00986.x.
- Williams, J. G. *et al.* (2000) 'Elucidation of binding determinants and functional

consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(29), pp. 22172–9. doi: 10.1074/jbc.M000397200.

Wilson, T. R. *et al.* (2012) 'Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors', *Nature*, 487(7408), pp. 505–509. doi: 10.1038/nature11249.

Wolchok, J. D. *et al.* (2013) 'Nivolumab plus Ipilimumab in advanced melanoma', *New England Journal of Medicine*, 369(2), pp. 122–133. doi: 10.1056/NEJMoa1302369.

Wolchok, J. D. *et al.* (2017) 'Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma', *New England Journal of Medicine*, 377(14), pp. 1345–1356. doi: 10.1056/NEJMoa1709684.

Wong, D. J. L. *et al.* (2014) 'Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH722984 against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma', *Molecular Cancer*, 13(1), p. 194. doi: 10.1186/1476-4598-13-194.

X

Xiao, T. *et al.* (2018) 'Estrogen-regulated feedback loop limits the efficacy of estrogen receptor-targeted breast cancer therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(31), pp. 7869–7878. doi: 10.1073/pnas.1722617115.

Xing, F. *et al.* (2012) 'Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring V600E BRAF', *Oncogene*, 31(4), pp. 446–457. doi: 10.1038/onc.2011.250.

Xu, W. y McArthur, G. (2016) 'Cell Cycle Regulation and Melanoma', *Current Oncology Reports*, 18(6), p. 34. doi: 10.1007/s11912-016-0524-y.

Xu, X. L. *et al.* (2010) 'Tumor-associated retinal astrocytes promote retinoblastoma cell proliferation through production of IGFBP-5', *American Journal of Pathology*, 177(1), pp. 424–435. doi: 10.2353/ajpath.2010.090512.

Y

Yadav, V. *et al.* (2012) 'Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp. 28087–98. doi: 10.1074/jbc.M112.377218.

Yadav, V. *et al.* (2014) 'The CDK4/6 inhibitor LY2835219 overcomes vemurafenib resistance resulting from MAPK reactivation and cyclin D1 upregulation', *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(10), pp. 2253–2263. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0257.

Yang, H., Higgins, B. *et al.* (2010) 'RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models', *Cancer Research*, 70(13), pp. 5518–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0646.

Yang, Q., Deng, X. *et al.* (2010) 'Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein', *Cancer Cell*, 18(3), pp. 258–67. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.008.

Yang, Q., Liao, L. *et al.* (2013) 'BMK1 is involved in the regulation of p53 through disrupting the PML-MDM2 interaction', *Oncogene*, 32(26), pp. 3156–3164. doi: 10.1038/onc.2012.332.

Yang, S. H., Sharrocks, A. D. y Whitmarsh, A. J. (2013) 'MAP kinase signalling cascades and

transcriptional regulation', *Gene*, 513(1), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.033.

Yao, Z. *et al.* (2015) 'BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition', *Cancer Cell*, 28(3), pp. 370–383. doi: 10.1016/j.ccell.2015.08.001.

Yasumoto, K. *et al.* (1994) 'Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene', *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), pp. 8058–8070. doi: 10.1128/mcb.14.12.8058.

Yoshida, A., Lee, E. K. y Diehl, J. A. (2016) 'Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6', *Cancer Research*, 76(10), pp. 2990–3002. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2931.

Young, H. L. *et al.* (2017) 'An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition', *Journal of Experimental Medicine*, 214(6), pp. 1691–1710. doi: 10.1084/jem.20160855.

Young, R. J. *et al.* (2014) 'Loss of CDKN2A expression is a frequent event in primary invasive melanoma and correlates with sensitivity to the CDK4/6 inhibitor PD0332991 in melanoma cell lines', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(4), pp. 590–600. doi: 10.1111/pcmr.12228.

Yusoff, P. *et al.* (2002) 'Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf', *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), pp. 3195–3201. doi: 10.1074/jbc.M108368200.

Z

Zakrzewska, M. *et al.* (2013) 'ERK-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor receptor 1 on Ser777 inhibits signaling', *Science Signaling*, 6(262), p. ra11. doi: 10.1126/scisignal.2003087.

Zeng, H. *et al.* (2018) 'Bi-allelic Loss of CDKN2A Initiates Melanoma Invasion via BRN2 Activation', *Cancer Cell*, 34(1), pp. 56–68.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.014.

Zhang, T. *et al.* (2016) 'The genomic landscape of cutaneous melanoma', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 29(3), pp. 266–283. doi: 10.1111/pcmr.12459.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'IGF1R signaling drives antiestrogen resistance through PAK2/PIX activation in luminal breast cancer', *Oncogene*, 37(14), pp. 1869–1884. doi: 10.1038/s41388-017-0027-9.

Zhang, Y. X. *et al.* (2014) 'Antiproliferative effects of CDK4/6 inhibition in CDK4-amplified human liposarcoma in vitro and in vivo', *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(9), pp. 2184–2193. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0387.

Zheng, B. *et al.* (2009) 'Oncogenic B-Raf Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation', *Molecular Cell*, 33(2), pp. 237–247. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.026.

Zhu, J. *et al.* (1998) 'Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf', *Genes & Development*, 12(19), pp. 2997–3007. doi: 10.1101/gad.12.19.2997.

Zimmermann, S. y Moelling, K. (1999) 'Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)', *Science*, 286(5445), pp. 1741–1744. doi: 10.1126/science.286.5445.1741.

Zmajkovicova, K. *et al.* (2013) 'MEK1 is required for PTEN membrane recruitment, AKT regulation, and the maintenance of peripheral tolerance', *Molecular Cell*, 50(1), pp. 43–55. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.037.

Zou, G. M., Chen, J. J. y Ni, J. (2006) 'LIGHT induces differentiation of mouse embryonic stem cells associated with activation of ERK5', *Oncogene*, 25(3), pp. 463–469. doi: 10.1038/sj.onc.1208987.

Zuo, L. *et al.* (1996) 'Germline mutations in the p16(INK4a) binding domain of CDK4 in familial melanoma', *Nature Genetics*, 12(1), pp. 97–99. doi: 10.1038/ng0196-97.

ANEXOS

Publicaciones de la autora relacionadas con el trabajo de la Tesis Doctoral:

- **ANEXO I:** Díaz-Martínez M., **Benito-Jardón L.**, Alonso L., Koetz-Ploch L., Hernando E., Teixidó J. (2018) 'miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma', *Cancer Research*, 78(4), pp. 1017-1030.
- **ANEXO II:** Díaz-Martínez M., **Benito-Jardón L.**, Teixidó J. (2018) 'New insights in melanoma resistance to BRAF inhibitors: a role for microRNAs', *Oncotarget*, 9(83), pp. 35374-35375.
- **ANEXO III:** **Benito-Jardón L.**, Díaz-Martínez M., Arellano-Sánchez N., Vaquero-Morales P., Esparís-Ogando A., Teixidó J. (2019) 'Resistance to MAPK inhibitors in melanoma involves activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 pathway', *Cancer Research*, 79(9), pp. 2244-2256.

ANEXO I

miR-204-5p and miR-211-5p Contribute to BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma

Marta Díaz-Martínez¹, Lucía Benito-Jardón¹, Lola Alonso², Lisa Koetz-Ploch³, Eva Hernando³, and Joaquin Teixidó¹



Abstract

Melanoma treatment with the BRAF V600E inhibitor vemurafenib provides therapeutic benefits but the common emergence of drug resistance remains a challenge. We generated A375 melanoma cells resistant to vemurafenib with the goal of investigating changes in miRNA expression patterns that might contribute to resistance. Increased expression of miR-204-5p and miR-211-5p occurring in vemurafenib-resistant cells was determined to impact vemurafenib response. Their expression was rapidly affected by vemurafenib treatment through RNA stabilization. Similar effects were elicited by MEK and ERK inhibitors but not AKT or Rac inhibitors. Ectopic expression of both miRNA in drug-naïve human melanoma cells was sufficient to confer vemurafenib

resistance and more robust tumor growth *in vivo*. Conversely, silencing their expression in resistant cells inhibited cell growth. Joint overexpression of miR-204-5p and miR-211-5p durably stimulated Ras and MAPK upregulation after vemurafenib exposure. Overall, our findings show how upregulation of miR-204-5p and miR-211-5p following vemurafenib treatment enables the emergence of resistance, with potential implications for mechanism-based strategies to improve vemurafenib responses.

Significance: Identification of miRNAs that enable resistance to BRAF inhibitors in melanoma suggests a mechanism-based strategy to limit resistance and improve clinical outcomes. *Cancer Res*; 78(4): 1017–30. ©2017 AACR.

Introduction

The BRAF V600E mutation is the most prevalent genetic alteration in malignant melanoma, and the focus of recently developed BRAF inhibitors (BRAFi), such as vemurafenib and dabrafenib (1–3). Both agents have provided substantial benefits for melanoma patients, but a major challenge in melanoma treatment with MAPK-targeted therapy is an almost universal emergence of resistance that leads to patient relapse. The most frequent mechanisms involved in BRAFi resistance of melanoma cells converge in the reactivation of the MAPK pathway usually following NRAS mutations (4), alterations in BRAF splicing (5), as well as BRAF amplification (6, 7). Another signaling route mediating melanoma resistance to BRAFi is the PI3K–Akt pathway, which becomes hyperactivated in some patients (8). Yet, a significant portion (40%) of tumors displays unknown

resistance mechanisms (9) that cannot be accounted for genetic alterations (10).

The class of small noncoding RNAs called miRNAs has emerged as key posttranscriptional regulator in tumor progression. Mature miRNAs are 20–30 nucleotide-long RNAs that, by targeting mRNA transcripts, keep the transcriptome under tight control. miRNAs base pair to partially complementary motifs in target mRNAs, usually in the 3' UTR, leading to translational repression or exonucleolytic mRNA decay (11). The first indication that miRNAs play important roles in cancer came from an early study showing that the miR-15/16 cluster is frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia, therefore implicating miRNAs as tumor suppressors (12). Moreover, transgenic expression of miR-21 initiates lymphomagenesis in mice (13). Despite a more frequent pattern of reduction in the levels of miRNAs in cancer, several miRNAs are upregulated and play oncogenic roles, which have led to call them oncomiRs, such as the miR-17/92 cluster, which is upregulated in several cancer cell types (14).

Large-scale expression profiling and deep-sequencing approaches have revealed that miRNAs play pivotal roles in melanoma progression. Some of these miRNAs have tumor suppressor roles, such as let-7b and miR-137 (15, 16), whereas other act as oncomiRs, including miR155, miR-30b/30d, and miR-182 (17–19). Importantly, miR-137 expression correlates with melanoma's patient clinical outcome, with lower miR-137 levels associated to shorter survival of stage IV patients (20). Various miRNAs control melanoma cell invasion and metastasis, including the miR-211 (21).

Several miRNAs have been linked to resistance responses in different cancers (22), but only few recent studies have so far addressed the possible involvement of miRNAs in BRAFi resistance of melanoma. Thus, miR-200c and miR-7 have been shown to be reduced in BRAFi-resistant cells (23, 24). In this study, we

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain. ²Bioinformatics and Biostatistics Unit, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain. ³Department of Pathology, New York University School of Medicine, NYU Langone Medical Center, New York, NY.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Current address for L. Alonso: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid 28029, Spain.

Corresponding Author: Joaquin Teixidó, Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain. Phone 349-1837-3112; Fax 349-1536-0432; E-mail: joaquin@ Cib.csic.es

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1318

©2017 American Association for Cancer Research.

performed RNA-seq analyses comparing miRNA expression in parental and vemurafenib-resistant melanoma cells, and identified and characterized selected miRNAs that contribute to BRAFi resistance.

Materials and Methods

Cells and reagents

The human melanoma cell line A375 was latest authenticated in August 2017 at Secugen by short tandem repeat analysis. The melanoma cell lines SK-Mel-103, SK-Mel-28, and SK-Mel-147 were gifts from Dr. Marisol Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain; April 2014), and were not authenticated in our laboratory. All cell lines were used within 5–50 passages of thawing the original stocks, were tested every 3 months for mycoplasma contamination, and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco; complete medium). Vemurafenib-resistant A375 cells (A375-VR) were derived from parental A375 cells by treatment with sequential increases of vemurafenib (Selleckchem) concentrations, from 10 nmol/L to 1.3 μ mol/L, and were finally maintained as an uncloned resistant cell population in complete medium with 1.3 μ mol/L of vemurafenib. We also obtained A375 cells growing with the MEK inhibitor trametinib (Selleckchem; 40 nmol/L; A375-TR).

Vectors and lentiviral-mediated gene transfer

Lentiviral vectors carrying miRNA precursor transcripts (H-miR-204-5p or H-miR-211-5p; System Biosciences), or anti-sense miRNA sequences (Zip-miR-140-3p; System Biosciences) were used to stably overexpress mature miRNAs or inhibit the endogenous miRNAs, respectively. Pre-miR and anti-miR-scramble sequences (H-scr and Zip-scr) were used as negative controls (System Biosciences). For virus production, HEK-293FT cells were transfected with H-miR or Zip-miR vectors, pPAX2 and pMD2G, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Viruses were collected and filtered 48 hours after transfection, and infection of A375 or SK-Mel-28 cells was performed for 72 hours using polybrene (Millipore). Cells were subsequently assessed by real-time quantitative PCR (qPCR). Triple-miRNA transductants were derived from H-miR-204 cells that were coinfecting with H-miR-211 and Zip-miR-140 viruses using polybrene. SK-Mel-28 double-miRNA transductants were derived from SK-Mel-28 H-miR-211 cells that were infected with H-miR-204 viruses.

Oligonucleotide and siRNA transient transfection

miRIDIAN miRNA Hairpin Inhibitors (Dharmacon) for miRNA-204-5p and miRNA-211-5p (40 nmol/L) were transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol. miRIDIAN miRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1 (Dharmacon) was used as negative control. siRNAs were transfected using Interferin (Polyplus Transfection), following manufacturer's instructions. PAX6 and MITF SMARTpool siRNAs were purchased from Dharmacon. Sequences for control and STAT3 siRNAs (Sigma-Aldrich) are provided in Supplementary Table S1A. Transfection efficiency was monitored by qPCR at 48 hours.

Cell proliferation

Cells were seeded in complete medium into 96- or 6-well plates, treated for different times with vemurafenib, and analyzed by staining with crystal violet and measurement of absorbance at 590 nm after being dissolved with 15% acetic acid. For MTT

assays, 8,000 or 5,000 cells were seeded with or without serum in triplicates the day before treatment, and after 24 or 48 hours, respectively, 10 μ L of MTT reagent (Sigma-Aldrich; 5 mg/mL) were added for 1.5 hours. MTT was solubilized using DMSO and plates were read at 540 nm.

Western blotting and GTPase assays

Following cell lysis (25), proteins were resolved by SDS/PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and detected by chemiluminescence. Densitometry of the resulting bands was performed using ImageJ software. GTPase assays to detect the active forms of Ras were performed as described previously (25), using GST-RAF-RBD and immunoblotting with anti-Ras antibodies.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted using miRNeasy Mini Kit (Qiagen). To analyze miRNA expression, we used the miRNA-specific TaqMan MicroRNA Assay Kits (Applied Biosystems). miRNA-enriched RNA was first reverse-transcribed with the TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), and quantitative PCR was performed in triplicate with corresponding TaqMan PCR primers (Applied Biosystems), and TaqMan Universal Master Mix, according to the manufacturer's instructions. The RNU44 small RNA was used for normalization. For mRNA expression analyses, reverse transcription was performed using M-MLV-RT (Promega), and quantitative PCR was performed using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Assays were performed in triplicate and results normalized for the expression levels of TBP (TATA-binding protein). Quantitative PCR was analyzed using the LightCycler 480 (Roche). Oligonucleotide sequences are provided in Supplementary Table S1B.

Small RNA-Seq and data analysis

RNA was extracted using the mirVana miRNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific). Small RNA sequencing was performed in duplicate at the Genomics Unit of the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid, Spain), using next-generation sequencing (NGS, Illumina HiSeq 2500, Illumina). For NGS data analysis, 3' adapters were trimmed from sequencing reads using CutAdapt 1.7.1. Software. The remaining reads were mapped to known human mature miRNAs database (miR-Base21) using Bowtie version 1.0.0 (global alignment), where 100% identity between reads and known miRNAs sequences was required. The total read count for each sample was scaled relative to the library size. Differential expression analysis between samples was performed using DESeq2 R package (26) or BIOSAGE library (27). Differentially expressed miRNAs between samples were considered using absolute Log₂FC (fold change) criteria of 0.9. *P* values for multiple tests were calculated using Benjamini-Hochberg correction and only those miRNAs with *P* < 0.05 values were selected for further analyses. GEO (Gene Expression Omnibus) accession number for the RNA sequencing: GSE107576.

Animal studies

For xenografting studies, we followed the described method (28). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee approved the protocols used for experiments with mice. Briefly, NOD/SCID/IL2gR^{-/-} (NSG) mice were subcutaneously or intravenously inoculated with 1×10^6 parental or A375-VR cells in 0.2-mL PBS. Subcutaneous tumor growth was

inspected on a daily basis and tumor volumes measured until day 36, when all mice were sacrificed. Intravenously injected mice were sacrificed when signs of respiratory stress were noted and/or when weight sharply decreased. Lung and liver metastases were excised, minced, and filtered through 40- μ m filters (BD Biosciences). Isolated melanoma cells were cultured for 10–15 days before testing them in MTT assays. For experiments involving vemurafenib administration, 1.5×10^6 H-Scr or triple-miR A375 cells were subcutaneously inoculated, and after 20 days (tumor volume approximately 100 mm³), NSG mice were randomized in four groups and daily treated intraperitoneally with vehicle (5% DMSO + 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) or vemurafenib (25 mg/kg). Tumor volume was measured three times per week.

Statistical analyses

Unless otherwise indicated, mean values and SDs are representative of one of three independent experiments. Data were analyzed by Student *t* test or one-way ANOVA, followed by Tukey–Kramer multiple comparison test. In all analyses, the minimum acceptable level of significance was $P < 0.05$.

Results

Characterization of vemurafenib-resistant melanoma cells

As reported (1), A375 melanoma cells carrying the BRAF V600E mutation were sensitive to vemurafenib as well as to the MEK inhibitor trametinib (Supplementary Fig. S1A). Unlike A375, SK-Mel-103 cells expressing wild-type (wt) BRAF and Q61R N-Ras were insensitive to vemurafenib concentrations up to 1 μ mol/L, while they were sensitive to trametinib. Accordingly, Erk1/2 activation in A375 cells was gradually lost at increasing concentrations of vemurafenib or trametinib, enhanced in SK-Mel-103 cells exposed to vemurafenib, and blocked when these cells were incubated with trametinib (Supplementary Fig. S1B).

A375 cells were exposed to sequential vemurafenib increases to a final concentration of 1.3 μ mol/L, rendering a cell population resistant to up to 2 μ mol/L vemurafenib (Fig. 1A). When vemurafenib-resistant cells (A375-VR) were cultured without vemurafenib for up to 4 weeks and then replated in the presence of vemurafenib, they remained fully resistant (Fig. 1B; Supplementary Fig. S1C). Determination of *in vivo* tumor cell growth using subcutaneously inoculated NSG mice revealed that A375-VR tumors grew faster than parental cell tumors (Fig. 1C, top). Furthermore, based on the signs of respiratory stress and/or sharp decrease in weight, mice intravenously injected with A375-VR cells were sacrificed significantly sooner than those inoculated with parental cells (Fig. 1C, bottom). A375 and vemurafenib-resistant cells displayed similar metastasis degrees to both lung and livers (66 ± 11 and 16 ± 5 for A375, and 57 ± 16 and 18 ± 6 for A375-VR, respectively). Cell proliferation assays showed that cells extracted from lung and liver metastases from mice injected with A375-VR cells retained resistance to vemurafenib relative to cells from metastases of mice inoculated with parental cells (Supplementary Fig. S1D).

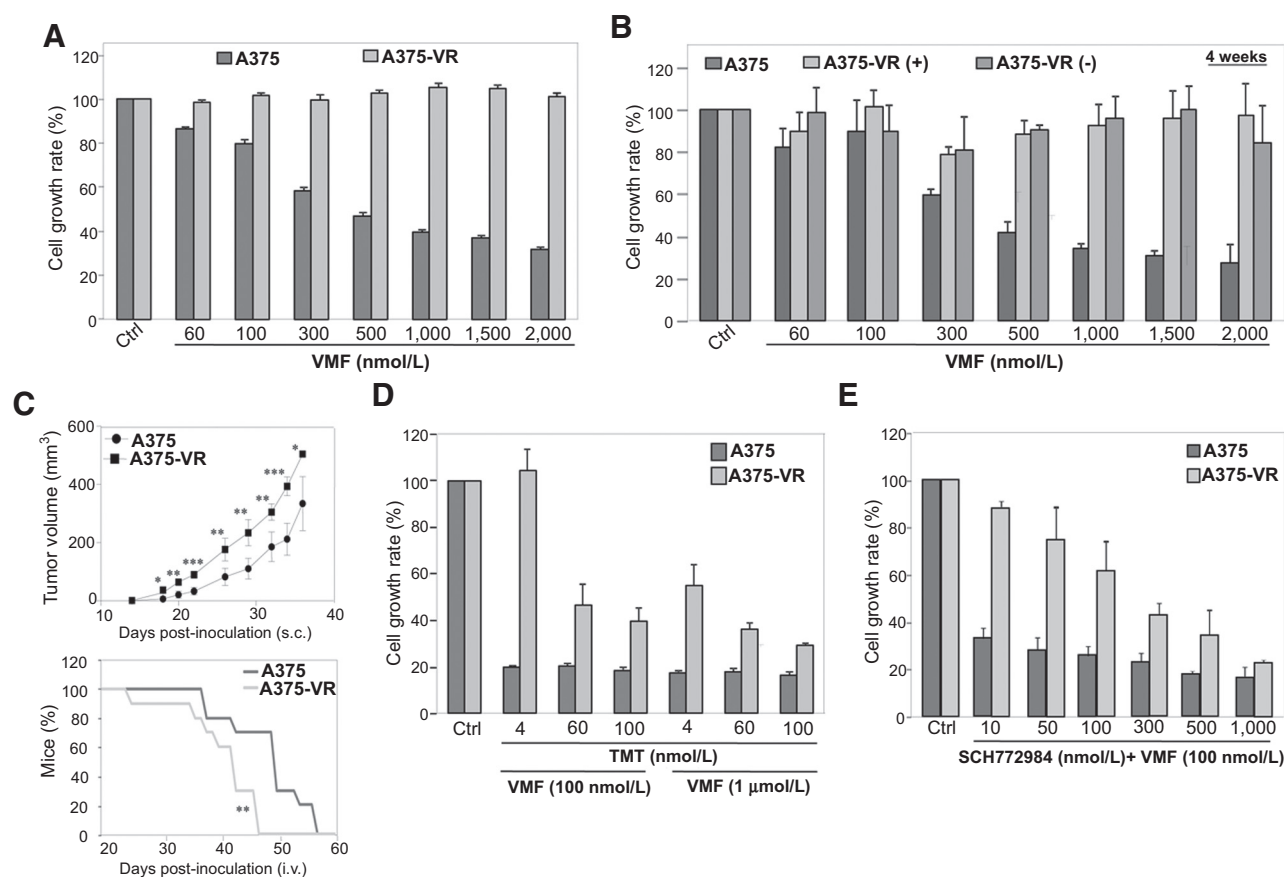
Cells resistant to vemurafenib also displayed partial resistance to trametinib and to the Erk1/2 inhibitor SCH772984, whereas they were sensitive to the Akt inhibitor triciribine (Supplementary Fig. S2A–S2C). Importantly, A375-VR cells displayed resistance to vemurafenib combined either with trametinib or SCH772984 (Fig. 1D and E).

Although basal Erk1/2 and MEK levels are slightly increased in A375-VR cells relative to parental ones, nevertheless, vemurafenib-resistant cells showed higher levels of activation of MEK, Erk1/2, and its downstream effector RSK than parental counterparts, which was linked to stimulation of the GTPase Ras (Fig. 2A and B). Furthermore, we detected overexpression of 90-kDa BRAF in vemurafenib-resistant cells, which was not observed in A375, A375-TR, the BRAF wt SK-Mel-103 and SK-Mel-147, and in BRAF wt/N-Ras wt BLM melanoma cells (Fig. 2C). Sequence analyses confirmed that resistant cells remained mutant V600E for BRAF and wt for NRAS (not shown). We did not detect diminished levels in A375-VR cells of SPRED, an inhibitor of MAPK activation (29), or increased expression of COT, whose overexpression is associated to resistance to BRAFi (Supplementary Fig. S2D; ref. 7). The partial resistance of A375-VR cells to trametinib and to SCH772984 was linked with sustained Erk1/2 and MEK activation (Supplementary Fig. S2E and S2F). In addition to enhanced MAPK activation, the PI3K pathway was also activated in A375-VR cells, as revealed by increased Akt and S6 phosphorylation (Fig. 2D).

The A375-VR cells displayed a blockade of invasion across Matrigel relative to parental counterparts (Supplementary Fig. S3A), which was linked to increased Rac and RhoA activation in A375-VR cells (Supplementary Fig. S3B). These results raise the possibility that excessive Rho GTPase activation could impair resistant cell migration and invasion. As increased Rac activation involving the RAC P29S mutation has been associated to resistance to BRAFi (30), we tested whether A375-VR cell resistance could be affected by the Rac inhibitor NSC23766. Both parental and A375-VR cells showed similar sensitivity to increasing NSC23766 concentrations (Supplementary Fig. S3C), and combination of the Rac inhibitor together with increasing vemurafenib concentrations did not cause significant reduction in A375-VR cell proliferation relative to that intrinsically caused by NSC23766 (Supplementary Fig. S3D). We detected a tendency, albeit not statistically significant of a small increase in A375-VR cell viability, in the presence of 25 μ mol/L of the Rac inhibitor starting at 500 nmol/L of vemurafenib. The molecular mechanistic of the potential counteraction between NSC23766 and vemurafenib are not known. In addition, NSC23766 did not affect the increased Erk1/2 phosphorylation shown by the resistant cells (Supplementary Fig. S3E), suggesting that resistance to vemurafenib was independent of the increased Rac activation exhibited by A375-VR cells.

Identification of miRNAs differentially expressed in A375-VR cells

We performed small RNA-seq from parental and A375-VR cells with the aim of identifying miRNAs whose altered expression could potentially contribute to melanoma resistance to vemurafenib. Sequences were aligned against the miRBase21 database, and following DESeq2 and BioSAGE analyses, the expression of four miRNAs, miR-204-5p, miR-211-5p, miR-504-5p, and miR-509-3p was found to be significantly upregulated in A375-VR cells compared with A375, whereas miR-4454, miR-140-3p, and miR-210-3p were reduced (Supplementary Table S2). Expression of miR-204-5p, miR-211-5p, miR-509-3p, miR-140-3p, and miR-504-5p was detected in samples from two different cohorts of melanoma patients (not shown), whereas no expression of miR-4454 and miR-210-3p was found, which led us to discontinue their study.

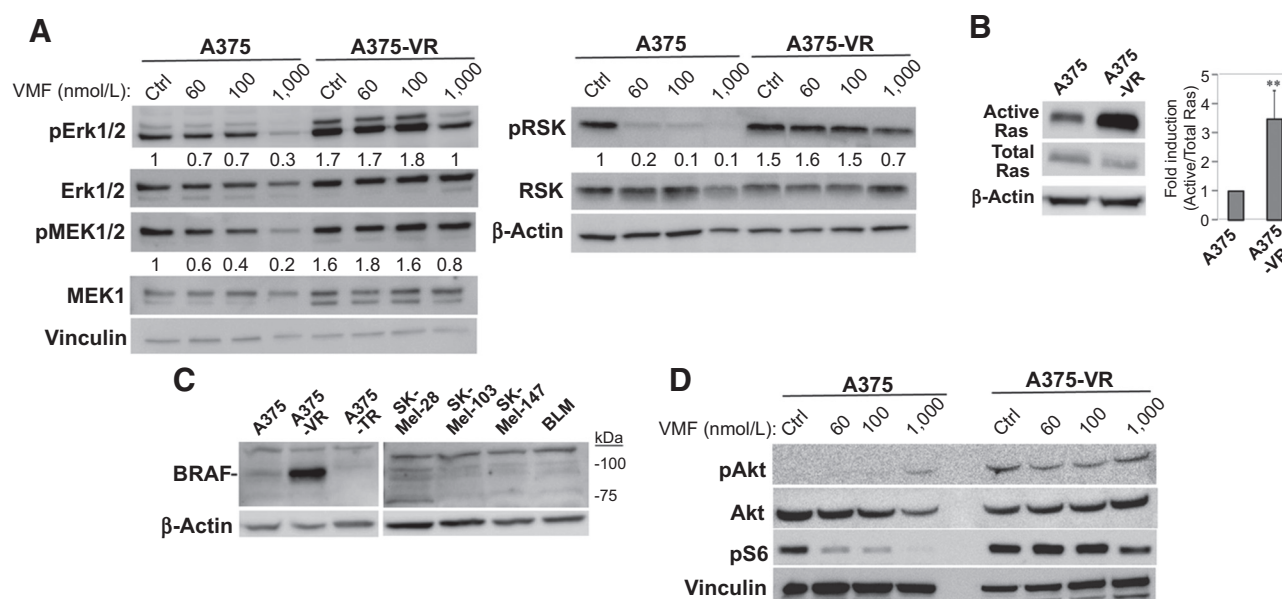
**Figure 1.**

Characterization of vemurafenib-resistant melanoma cells. **A**, Cells were tested in MTT assays (48 hours) in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations of vemurafenib (VMF; $n = 4$). **B**, A375-VR cells were incubated for 4 weeks without (–) or with vemurafenib (+; 1.3 $\mu\text{mol/L}$), and subsequently subjected for 48 hours to MTT assays as in **A**. Parental A375 cells are shown as control. **C**, Cells were subcutaneously (top) or intravenously (bottom) inoculated into NSG mice in the absence of drug treatment, and tumor growth and percentage of alive mice, respectively, were assessed. $n = 9$ –10 mice/condition; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **D** and **E**, Cells were incubated for 48 hours without (Ctrl) or with the indicated concentrations of vemurafenib, trametinib (TMT), or SCH772984 ($n = 3$).

Subsequent qPCR experiments validated the changes for miR-204-5p, miR-211-5p, miR-504-5p, miR-509-3p, and miR-140-3p expression in A375-VR cells (Fig. 3A). As miR-504-5p expression was very low in A375 and A375-VR cells, we decided to also cease its study. To analyze that the observed miRNA alterations in A375-VR cells are independent of vemurafenib presence, we assessed their miRNA levels by incubation in culture medium without vemurafenib for up to 6 days. The altered expression levels of miR-204-5p, miR-211-5p, miR-509-3p, and miR-140-3p in A375-VR cells were preserved in the absence of vemurafenib (Fig. 3B), supporting the stability of these miRNA alterations. We next investigated the dynamics of vemurafenib-dependent miRNA changes by incubating A375 cells with vemurafenib. Notably, significant increases in miR-204-5p, miR-211-5p, and miR-509-3p were already detected after 24 hours of vemurafenib exposure, reaching a plateau between 3 and 6 days (Fig. 3C). In addition, cell incubation with vemurafenib led to decreased miR-140-3p expression, although with slower kinetics. These results indicate that alterations in the expression of these miRNAs occur early after melanoma cell treatment with vemurafenib. We decided then to focus our studies on miR-204-5p, miR-211-5p,

and miR-140-3p, leaving miR-509-3p for future analyses. Dose-response experiments with A375 cells revealed substantial changes in miR-204-5p, miR-211-5p, and miR-140-3p expression already at vemurafenib concentrations of 100 nmol/L (Fig. 3D), whereas only minor but nonsignificant alterations in miRNA expression in A375-VR cells were observed upon increasing vemurafenib amounts. To study whether changes in miRNA expression can be detected in an additional vemurafenib-resistant BRAF V600E melanoma cell line, we used several resistant clones of SK-Mel 239 cells (31). Augmented levels of miR-204-5p and miR-211-5p were detected in 5 of 6 clones, whereas reduced expression of miR-140-3p was observed in 2 of the 6 clones (Supplementary Fig. S4A).

Interestingly, upregulation of miR-204-5p and miR-211-5p was also detected in parental and A375-VR cells exposed to trametinib, to SCH772984, or to the combination of vemurafenib and trametinib, whereas reduced levels of miR-140-3p were observed in A375 cells incubated with these inhibitors, but not in resistant cells (Figs. 3E and 4A). Meanwhile, the same miRNAs were unaltered in response to AKT or Rac inhibitors (Fig. 3E). Moreover, increase in miR-204-5p and miR-211-5p, and

**Figure 2.**

Analysis of Ras-MAPK and PI3-K/Akt activation in vemurafenib-resistant melanoma cells. **A**, Cells were incubated for 48 hours in medium (Ctrl) or vemurafenib (VMF), as indicated, and subsequently tested by immunoblotting using antibodies to the shown proteins. Numbers below gels indicate values from densitometric analyses ($n = 3$). **B**, Left, cells were subjected to Ras GTPase assays. Right, densitometric analyses of protein gel bands show the mean \pm SD of five independent experiments (**, $P < 0.01$). **C**, Cells were tested by Western blotting using anti-BRAF antibodies. **D**, Cells were subjected to immunoblotting to test for Akt and S6 activation.

reduction in miR-140-3p expression, were also observed in vemurafenib/trametinib-double resistant (VR/TR) A375 cells (Supplementary Fig. S4B and S4C). Of note, BRAFV600E-mutant SK-Mel-28 melanoma cells also showed enhanced miR-204-5p and miR-211-5p expression and decreased levels of miR-140-3p in response to incubation with vemurafenib or with combined vemurafenib and trametinib (Fig. 4B), suggesting that these miRNA changes might represent a common event in melanoma cells displaying this mutation. Together, these data point out to a strong correlation between changes in miR-204-5p, miR-211-5p, and miR-140-3p expression in melanoma and BRAF/MEK/Erk1/2 inhibition, but not PI3K/Akt or Rac blockade. Normal foreskin melanocytes were also tested for potential alterations in miRNA expression after exposing them to vemurafenib and trametinib. Whereas miR-204-5p expression was upregulated by vemurafenib, no significant changes in miR-211-5p and miR-140-3p expression were detected (Supplementary Fig. S4D). The molecular basis for vemurafenib-triggered increase in miR-204-5p levels in normal melanocytes and its functional consequences in melanocyte biology have not been addressed in this study.

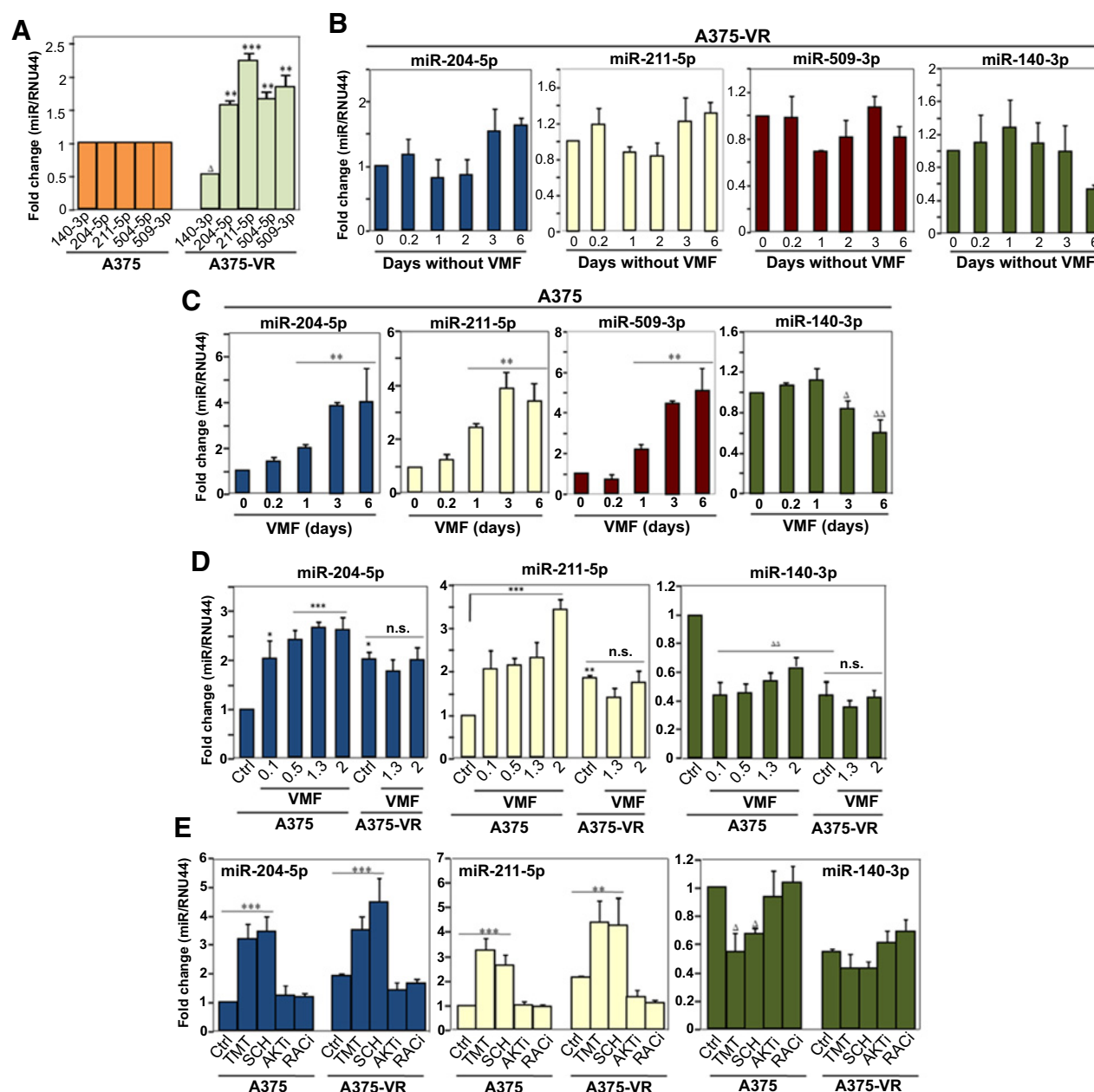
miR-204 is located in intron 6 of the *TRPM3* (Transient Receptor Potential Melastatin 3) gene, and it has been proposed that expression of miR-204 and *TRPM3* has common regulatory mechanisms (32, 33). Correlating with increased miR-204-5p expression in A375-VR cells, we found upregulated *TRPM3* mRNA in the resistant cells compared with parental ones (Fig. 4C, left). Furthermore, the PAX6 transcription factor promotes expression of miR-204-5p (34), and we observed a strong PAX6 induction in A375-VR cells, as well as in A375 cells treated with vemurafenib (Fig. 4C, right). In spite of the strong PAX6 upregulation in A375-VR cells, its silencing did not alter miR-204-5p expression

(Fig. 4D). Recent data revealed a role for STAT3 in regulation of miR-204-5p expression in melanoma (35). We then silenced STAT3 in A375-VR cells (30%–35% depletion) and found a significant decrease in the expression of miR-204-5p (Fig. 4E), suggesting that STAT3 is involved in the increased miR-204-5p expression in A375-VR cells.

miR-211 is expressed from the intron 6 of the melanoma marker *TRPM1* (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1; melastatin; refs. 36, 37), and we found that the increased miR-211-5p expression in A375-VR cells directly correlated with enhanced expression *TRPM1* relative to parental cells (Fig. 4F, left). As MITF (microphthalmia-associated transcription factor) regulates the transcription of *TRPM1*, we analyzed MITF expression and found no significant differences between A375 and A375-VR cells (Fig. 4F, middle). However, expression of tyrosinase (*TYR*), a marker of MITF activation (38), was enhanced in resistant cells both with and without vemurafenib, as well as in parental cells exposed to the inhibitor (Fig. 4F, right), together opening the possibility that increased miR-211-5p expression in A375-VR cells could be dependent of MITF activity. However, MITF silencing in A375-VR cells did not cause detectable alterations in miR-211-5p expression (Fig. 4G), suggesting that upregulated miR-211-5p expression in A375-VR cells is independent of MITF activation.

Role of miR-204-5p, miR-211-5p, and miR-140-3p in melanoma resistance to vemurafenib

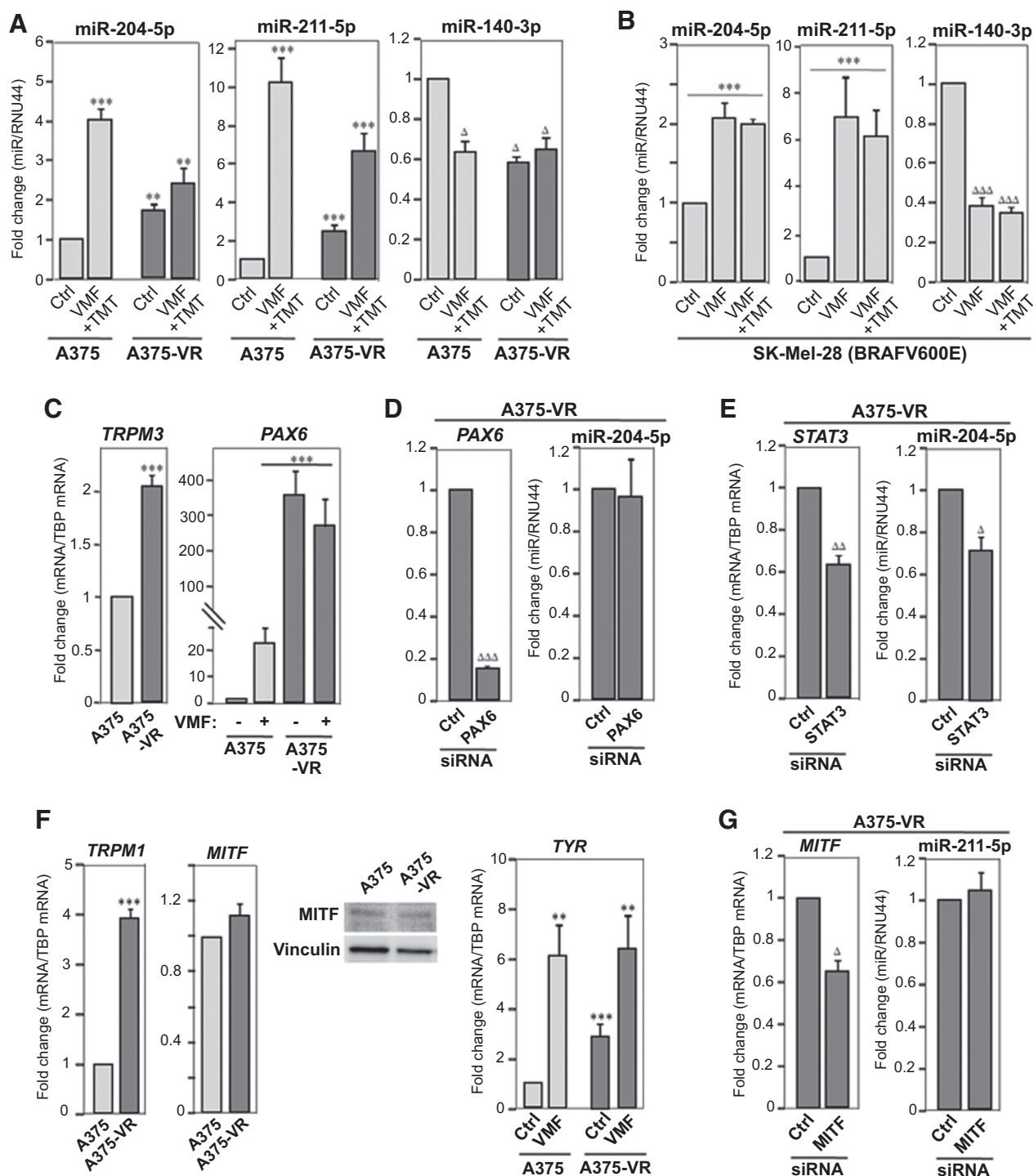
To test the potential involvement of the miRNAs in resistance to vemurafenib, A375 cells were infected with lentiviral vectors to either overexpress miR-204-5p or miR-211-5p, or to silence miR-140-3p (Supplementary Fig. S5A). MTT assays revealed a

**Figure 3.**

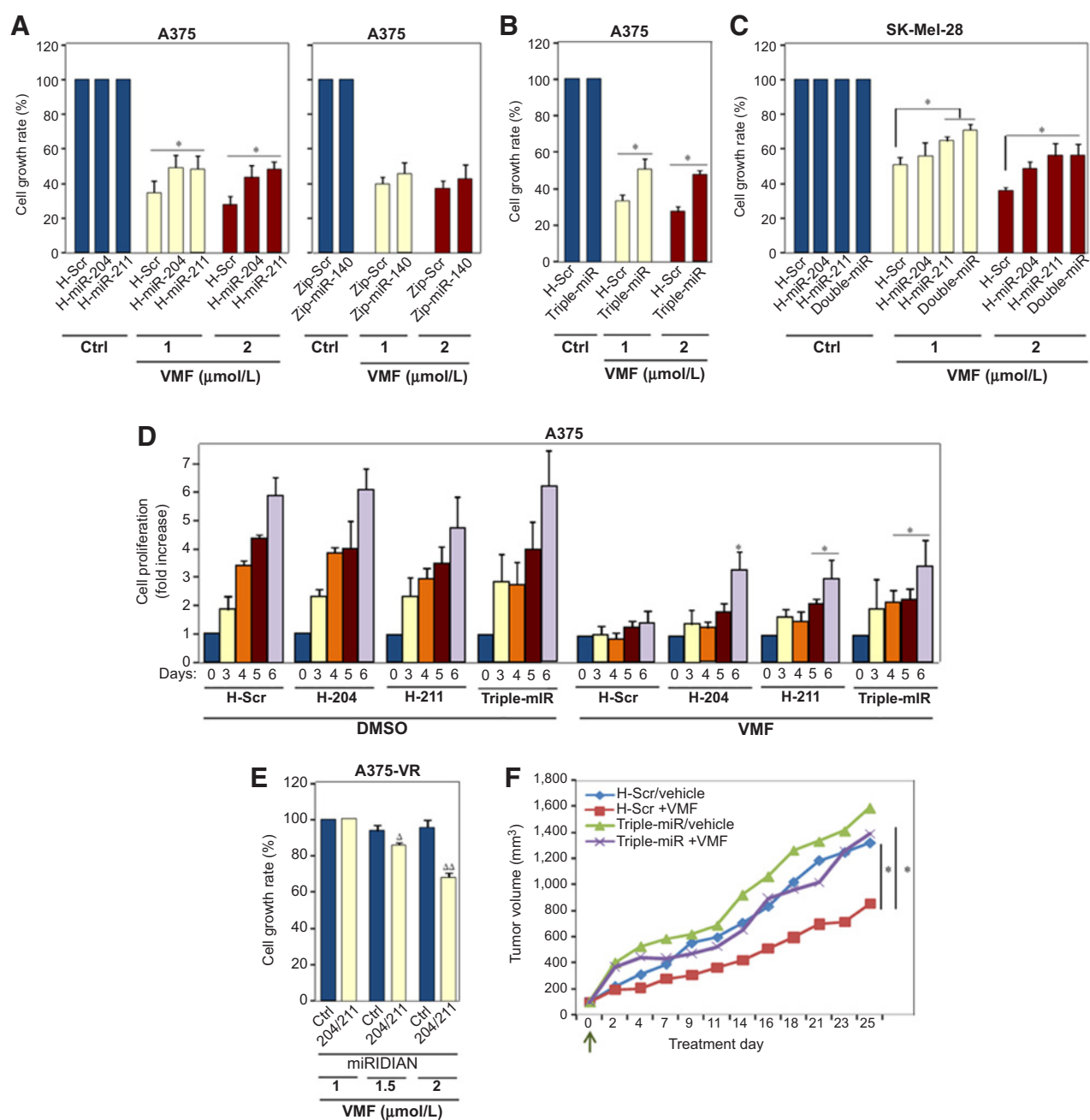
Identification of miRNAs differentially expressed in vemurafenib (VMF)-resistant A375 melanoma cells. **A**, qPCR validation of miRNA expression changes between parental and vemurafenib-resistant cells ($n = 5$). **B** and **C**, A375-VR or parental A375 cells were incubated for the indicated times in the absence (**B**) or presence of vemurafenib (1.3 $\mu\text{mol/L}$; **C**), and subsequently subjected to qPCR analyses for miRNA expression ($n = 3$). **D**, Dose-response analyses of miRNA expression in A375 and A375-VR cells cultured for 48 hours in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations (0.1–1.3 $\mu\text{mol/L}$) of vemurafenib. miRNA expression was significantly upregulated, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, or significantly reduced, Δ , $P < 0.05$; $\Delta\Delta$, $P < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta$, $P < 0.001$. **E**, Cells were incubated for 48 hours in medium (Ctrl) or in the presence of trametinib (TMT; 4 nmol/L), SCH727284 (50 nmol/L), tricinibine (5 $\mu\text{mol/L}$), NSC23766 (10 $\mu\text{mol/L}$), and subsequently analyzed by qPCR for expression of the shown miRNAs ($n = 3$ –4).

moderate but consistent increase in resistance to vemurafenib in cells overexpressing miR-211-5p or miR-204-5p relative to control transfectants (from 28%–34% cell viability in H-Scr control cells to 45%–49% in H-miR-211 or -miR-204; Fig. 5A, left). Instead, no significant variations in proliferation were observed in cells silenced for miR-140-3p (Fig. 5A, right).

We then generated A375 triple transductants that overexpress miR-204-5p and miR-211-5p, and that are knocked-down for miR-140-3p (triple-miR; Supplementary Fig. S5B). These triple-miR transductants also displayed enhanced resistance to vemurafenib relative to control cells (Fig. 5B; Supplementary Fig. S5C), overall indicating that miR-204-5p and miR-211-5p

**Figure 4.**

Characterization of miRNAs differentially expressed in vemurafenib (VMF)-resistant melanoma cells. **A** and **B**, Cells were incubated for 48 hours in medium (Ctrl), or in the presence of vemurafenib alone (1.3 μ M/L) or combined vemurafenib (100 nmol/L) and trametinib (TMT; 4 nmol/L), and subsequently analyzed by qPCR for expression of the shown miRNAs ($n = 3-4$). Expression was significantly upregulated, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, or significantly reduced, Δ , $P < 0.05$; $\Delta\Delta$, $P < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta$, $P < 0.001$. **C**, Cells were analyzed by qPCR for *TRPM3* and *PAX6* mRNA expression. **D** and **E**, Cells were transfected with control, PAX6, or STAT3 siRNA, and transfectants tested by qPCR for *PAX6*, *STAT3*, and miR-204-5p expression ($n = 3$). **F**, Cells were analyzed by qPCR for *TRPM1*, *MITF*, or *TYR* mRNA expression, or by immunoblotting for MITF protein levels ($n = 2-4$). **G**, Cells were transfected with control or MITF siRNA, and transfectants tested by qPCR for *MITF* and miR-211-5p expression ($n = 3$).

**Figure 5.**

Role of miR-204-5p, miR-211-5p, and miR-140-3p in melanoma resistance to vemurafenib. **A–C**, The indicated control or miRNA A375 and SK-Mel-28 transductants were tested in MTT assays in medium without serum, in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations of vemurafenib (VMF). Proliferation was significantly augmented. *, $P < 0.05$ ($n = 3–4$). **D**, Control (H-Scr cells), transductants overexpressing miR-204-5p or miR-211-5p, or triple-miR transductants were cultured in complete medium for the indicated times in the absence (DMSO samples) or presence of vemurafenib (100 nmol/L), and cell proliferation determined. Data is shown as fold increase in cell proliferation from three independent experiments. *, Proliferation was significantly augmented ($P < 0.05$), relative to the corresponding time points obtained with H-Scr control cells exposed to vemurafenib. **E**, A375-VR cells were transiently transfected with a combination of miRNA-204-5p and miRNA-211-5p miRIDIAN miRNA hairpin inhibitors or with a negative control, and transfectants tested by quadruplicate in cell proliferation assays in the absence of serum ($n = 2$; $^{\Delta}$, $P < 0.05$; $^{\Delta\Delta}$, $P < 0.01$). **F**, Cells were subcutaneously inoculated into NSG mice and after 20 days, mice were randomized in four groups and treated with vehicle or vemurafenib, as stated in Materials and Methods. Shown are tumor volume determinations. Arrow, starting of treatments. $n = 5$ mice/condition, *, $P < 0.05$.

overexpression, but not depletion of miR-140-3p in A375 cells, provides a survival advantage against vemurafenib. Supporting a role for miR-204-5p and miR-211-5p in providing resistance to

vemurafenib, SK-Mel-28 melanoma cells overexpressing either one or both miRNAs (double-miR; Supplementary Fig. S5D and S5E) exhibited a moderate and consistent increase in growth rate

in the presence of the inhibitor compared with control counterparts (Fig. 5C).

H-miR-204, H-miR-211, and triple-miR, but not Zip-miR-140 A375 cells, also showed increased resistance to trametinib and to combined vemurafenib and trametinib treatments, as compared with control cells (Supplementary Fig. S6A). Control H-Scr SK-Mel-28 transductants displayed close to 2-fold higher intrinsic resistance to trametinib than H-Scr A375 counterparts, and H-miR-211 and double-miR, but not H-miR-204 SK-Mel-28 transductants, exhibited higher resistance to trametinib and to combined vemurafenib and trametinib treatments than control cells (Supplementary Fig. S6B). Contrary to vemurafenib or trametinib, neither miR-204-5p nor miR-211-5p overexpression conferred resistance to SCH722984 (not shown), and only triple-miR cells displayed a moderate increase in growth rate with vemurafenib and SCH722984 (Supplementary Fig. S6C), but not with tricirbine (Supplementary Fig. S6D).

Further confirmation of miR-204-5p and miR-211-5p contribution to resistance to vemurafenib came from cell proliferation assays for 6 days in the presence of vemurafenib, which showed that H-miR-204, H-miR-211, and triple-miR stable cells have significantly higher proliferation than control H-Scr counterparts (Fig. 5D). Instead, Zip-miR-140-3p transductants lacked proliferation advantage when exposed to the inhibitor (not shown). To add further significance to these data, we silenced both miR-204-5p and miR-211-5p in A375-VR cells (Supplementary Fig. S6E), and tested cell viability in the presence of vemurafenib. Transfectants displayed decreased growth at 1.5–2 $\mu\text{mol/L}$ of vemurafenib (Fig. 5E), highlighting the involvement of these miRNAs in resistance to vemurafenib. Moreover, NSG mice subcutaneously inoculated with triple-miR cells displayed significantly larger tumor volumes following vemurafenib administration than mice inoculated with H-Scr control cells (Fig. 5F). No significant differences in tumor growth were observed in mice injected with triple-miR or H-Scr cells upon vehicle administration, or in mice inoculated with triple-miR cells and exposed to vehicle or vemurafenib.

We next used SK-Mel-103 cells to test the effect of vemurafenib in an inherently vemurafenib-resistant melanoma cell line. miR-204-5p expression was augmented by vemurafenib, but reduced when cells were incubated with both vemurafenib and trametinib (Supplementary Fig. S7A). No miR-211-5p expression was detected in these cells (not shown), and expression of miR-140-3p was unaltered in the presence of vemurafenib, and increased with combined vemurafenib and trametinib. We then silenced miR-204-5p in SK-Mel-103 cells and tested cell resistance after exposing them to increasing vemurafenib concentrations. The results revealed no significant differences in growth between miR-204-5p-knockdown cells and control counterparts (Supplementary Fig. S7B), overall indicating that miR-204-5p does not influence proliferation in inherently vemurafenib-resistant SK-Mel-103 cells.

Analyses of Erk1/2 activation revealed that vemurafenib-induced decrease in pErk1/2 was more attenuated in H-miR-211 and in triple-miR A375 cells than in control cells (Fig. 6A–C). Furthermore, reduced pMEK due to vemurafenib was more mitigated in H-miR-211 cells. As expected, when we extended cell exposure to vemurafenib to 1 week, pErk1/2 and pMEK levels sharply diminished, but higher phosphorylation of Erk1/2 and MEK in triple-miR cells than in control cells was observed (Fig. 6D). By week 3 of treatment with vemurafenib, pErk1/2

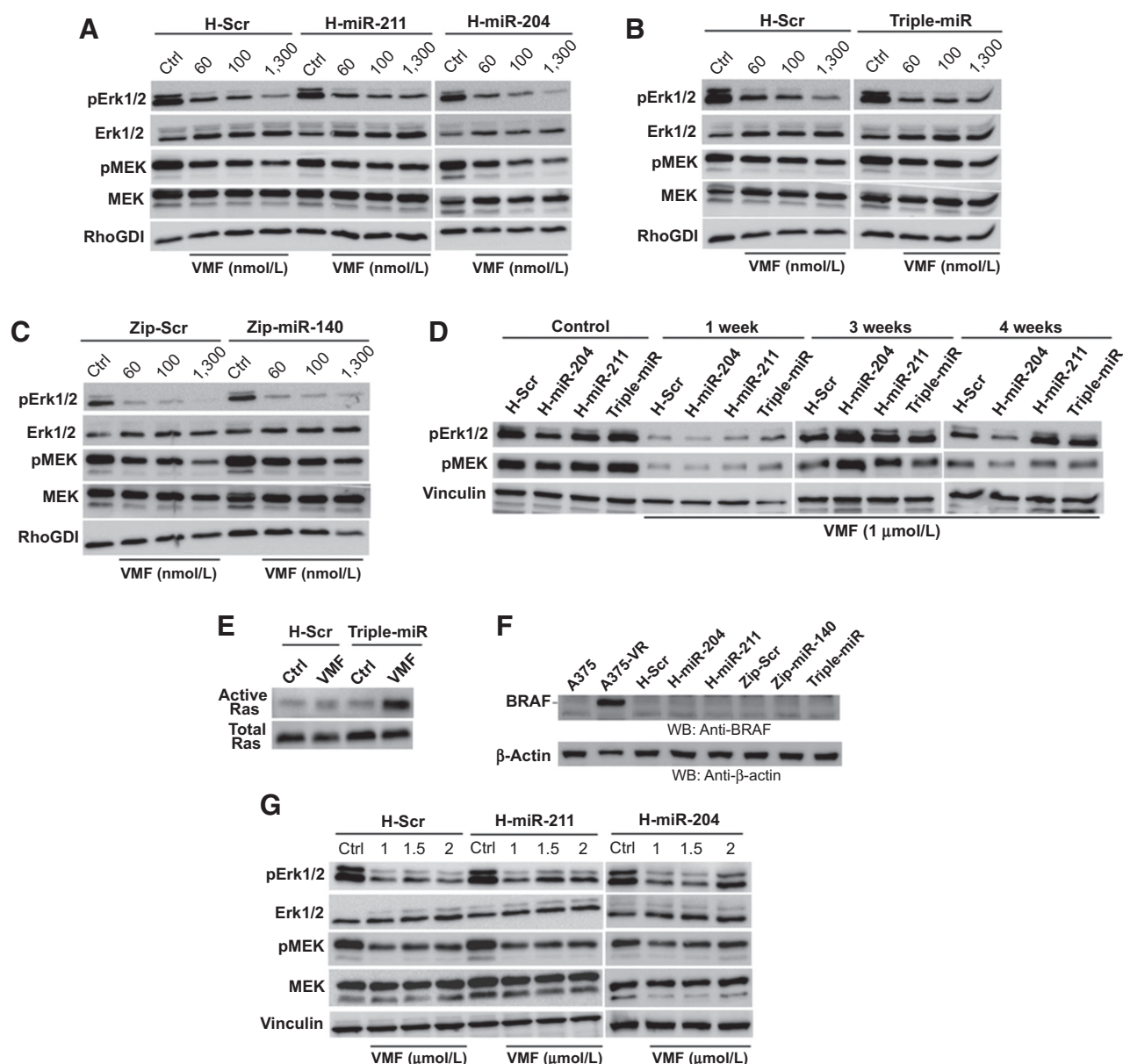
and pMEK levels were recovering in H-Scr cells, but triple-miR, as well as cells overexpressing miR-204-5p or miR-211-5p still showed remarkably higher pErk1/2 and pMEK. After 4 weeks with vemurafenib, H-miR-211 and triple-miR, but not H-miR-204 cells still exhibited higher pErk1/2 and pMEK1/2 than control cells (Fig. 6D). Furthermore, vemurafenib-exposed triple-miR transductants displayed substantially higher Ras activation levels than control cells (Fig. 6E). None of the different miRNA transductants exhibited BRAF overexpression shown by A375-VR cells (Fig. 6F). The attenuated decrease in Erk1/2 activation upon vemurafenib treatment was not only observed in A375 cells overexpressing miR-211-5p, but H-miR-211, as well as H-miR-204 SK-Mel 28 transductants, also displayed mitigated reduction in pErk1/2 relative to control cells (Fig. 6G).

Examination of miR-204-5p and miR-211-5p target expression

Data from previous published work and from available miRNA databases indicate that miR-204-5p and miR-211-5p share some common targets, including NUA1/ARK5, IGFBP5, TGF- β R11, Slug, and CHD5 (21, 37, 39, 40). qPCR analyses showed that *NUA1* mRNA was downregulated in A375-VR cells and in H-miR-204, H-miR-211, and triple-miR cells, but not in Zip-miR-140 counterparts (Fig. 7A, left). Moreover, *NUA1* expression was also reduced in SK-Mel-28 cells overexpressing miR-211-5p. Decreased NUA1 protein expression was confirmed in immunoblot analyses in A375-VR, H-miR-211, and triple-miR A375 cells, but not in H-miR-204 counterparts (Fig. 7A, right). Although *IGFBP5* and *TGF- β R11* mRNAs were reduced in cells overexpressing miR-204-5p or miR-211-5p, confirming that they represent targets for these miRNAs, their levels were increased in A375-VR cells (Fig. 7B, right; Supplementary Fig. S8A, left), indicating that other mechanisms overall upregulated their expression in the resistant cells. Interestingly, *IGFBP5* mRNA was enhanced in Zip-miR-140 transductants, suggesting that it might represent a miRNA target. Contrary to what it was expected, *SLUG* expression was increased in H-miR-204, H-miR-211, and in triple-miR transductants, as well as in A375-VR cells (Fig. 7B, right). No significant alterations in *CHD5* expression was detected in the miRNA transductants or in A375-VR cells (Supplementary Fig. S8A, right).

The miR-204-5p target ephrin B2 (*EFNB2*; ref. 41) was reduced in H-miR-204, triple-miR, and to a lower extent in A375-VR cells relative to their controls (Fig. 7C, left). However, we were unable to detect significant alterations in ephrin B2 protein expression in these cells (Fig. 7C, middle). *EFNB2* mRNA expression was also decreased in SK-Mel-28 cells overexpressing miR-204-5p or miR-211-5p, and furthermore, we could detect reduced ephrin B2 expression in H-miR-211 SK-Mel-28 cells (Fig. 7C). Although the expression of another putative miR-204-5p target, *SNAIL*, was moderately diminished in resistant cells, we did not observe variations in its levels in the miRNA transductants (Supplementary Fig. S8B).

The proapoptotic transcription factor CHOP/GADD153 and IGF-2R are well-known miR-211-5p targets (42, 43). We found that *CHOP* mRNA expression was reduced both in A375-VR and H-miR-211 cells, but not in SK-Mel-28 cells overexpressing miR-211-5p (Fig. 7D, left and right). To efficiently visualize CHOP protein expression in A375 cells, we incubated them with thapsigargin, an agent that elicits endoplasmic reticulum (ER) stress. We found decreased CHOP expression (25%–30%) in thapsigargin-exposed A375-VR cells compared with parental counterparts

**Figure 6.**

Analysis of Erk1/2 and MEK activation in miRNA transductants. **A–C**, A375 transductants were incubated for 24 hours in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations of vemurafenib (VMF), and subsequently subjected to immunoblotting. **D**, Cells were left untreated (Control) or incubated for the times shown with vemurafenib, and analyzed by Western blotting. **E**, Cells were incubated for 24 hours without (Ctrl) or with vemurafenib (1.3 μmol/L) and subsequently subjected to Ras GTPase assays. **F**, Parental and A375-VR cells, or the indicated transductants, were analyzed by immunoblotting using anti-BRAF antibodies. **G**, SK-Mel-28 transductants were incubated for 24 hours with or without vemurafenib, and subsequently subjected to immunoblotting. Loading controls were assessed with antibodies to RhoGDI, vinculin, or β-actin.

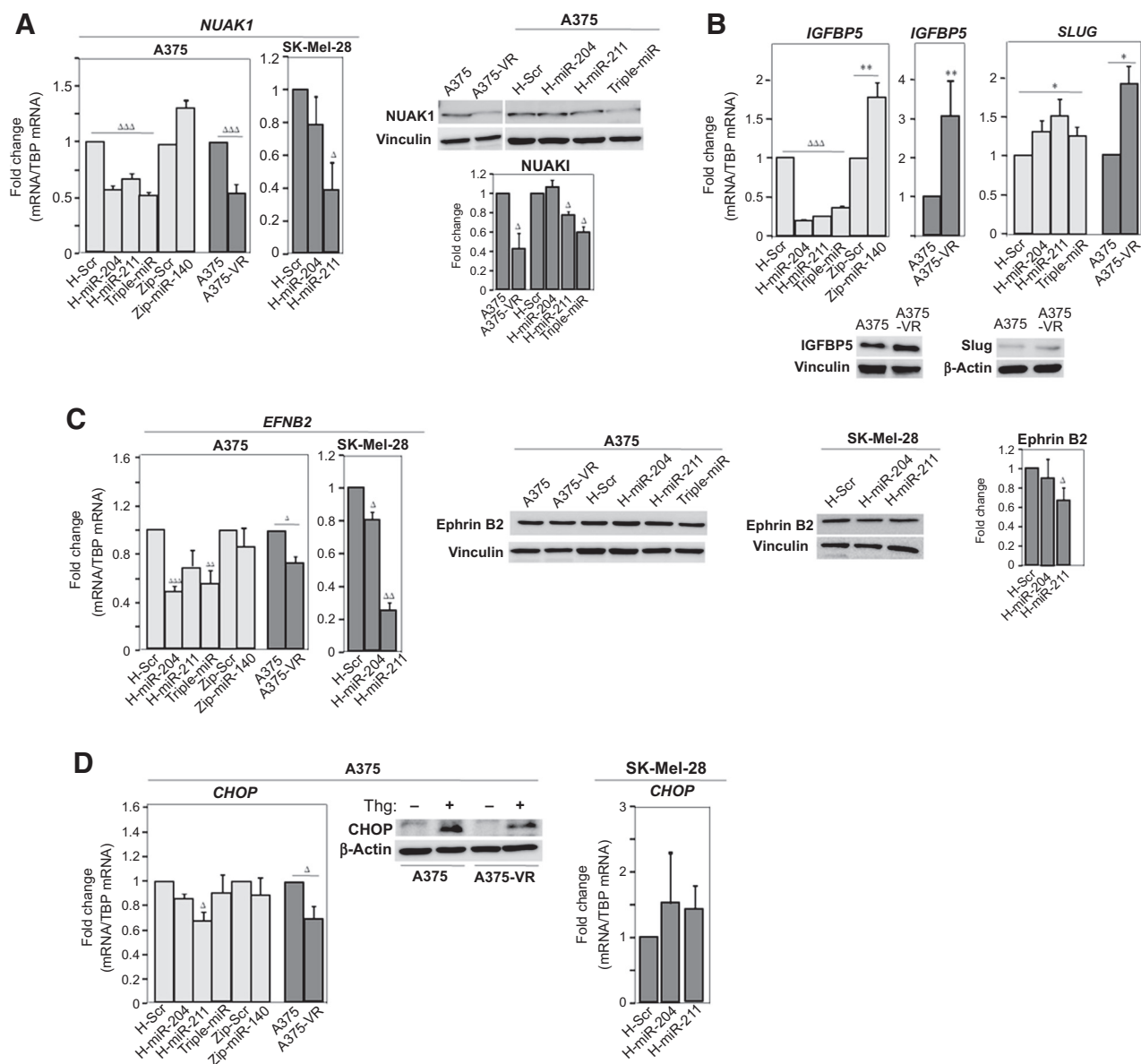
(Fig. 7D, middle). *IGF-2R* levels were not significantly altered in A375-VR cells relative to parental ones, or in the different miRNA transductants (Supplementary Fig. S8C). Finally, the expression of additional miR-204-5p and miR-211-5p targets, such as *RAB22A*, *CREB5*, *SOX4*, *BCL2*, *NFAT5*, and *POU3F2* was unaltered in vemurafenib-resistant cells (not shown).

Whereas *NUAK1*, *EFNB2*, and *CHOP* expression is reduced in A375-VR relative to A375 cells (Fig. 7A, C, and D), *NUAK1* and *EFNB2* were found to be increased in SK-Mel-103 compared with

A375 cells, and no significant differences between A375 and SK-Mel-103 cells were detected for *CHOP* expression (Supplementary Fig. S8D).

Discussion

Resistance to BRAFi in melanoma involves genetic alterations that lead to reactivation of the MAPK pathway or activation of PI3K/AKT signaling (4–7, 44, 45). In addition, there can be other

**Figure 7.**

Analyses of miRNA target expression in cells overexpressing miR-204-5p and miR-211-5p and in A375-VR cells. mRNA and protein levels for NUAK1 (**A**), IGFBP5 and Slug (**B**), Ephrin B2 (**C**), and CHOP were determined by qPCR or immunoblotting, respectively. Relative fold change values from the blots are also displayed. $\Delta\Delta\Delta$, expression was significantly reduced, $P < 0.001$; Δ , $P < 0.05$; $\Delta\Delta$, $P < 0.01$, or **, stimulated, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ ($n = 3-5$).

nongenetic alterations conferring melanoma resistance. Here we have generated A375 melanoma cells displaying resistance to vemurafenib with the goal of identifying changes in miRNA expression that could provide survival advantage against this inhibitor. Resistant A375-VR cells displayed Ras–MAPK pathway reactivation, as well as activation of PI3K/AKT, consistent with previous data (1). Activation of these pathways likely contributed to increased tumor growth in the A375-VR xenograft models. Vemurafenib-resistant cells also showed partial resistance to trametinib, as well as to combined vemurafenib and trametinib. We have not addressed whether additional mechanisms independently of Ras–MAPK reactivation, including Notch1 pathway

activation (46), or increased expression of PDGF β or EGF receptors (4, 47), contribute to vemurafenib resistance in A375-VR cells. Stability of the resistance was demonstrated both in *in vitro* and *in vivo* assays, such that lung and liver A375-VR metastases retained full resistance to vemurafenib after culturing tumor cells with the inhibitor.

Analyses of small RNAseq data and subsequent qPCR studies revealed increased miR-204-5p and miR-211-5p levels in A375-VR cells relative to parental counterparts, whereas miR-140-3p expression was reduced. Upregulation of miR-204-5p and miR-211-5p was already evident after 24 hours of cell exposure to vemurafenib, and was detected at low concentrations of the

inhibitor. miRNA alterations persisted for at least 6 days in the absence of vemurafenib, overall suggesting that miRNAs are rapidly increased by the inhibitor, but do not require its continuous presence. Of note, enhanced miR-204-5p and miR-211-5p expression was not exclusive of A375-VR cells, as it was also detected in *BRAF* V600E–mutant SK-Mel-239-VR melanoma cells. Together, these results strongly suggest that increased miR-204-5p and miR-211-5p expression could represent a common event during development of melanoma resistance to vemurafenib. Our results are in line with previous data showing that vemurafenib induces the expression of these miRNAs in A375 cells (35).

The rapid elevation of miR-204-5p and miR-211-5p levels was not only detected in A375 cells exposed to vemurafenib, but also to trametinib, to an ERK inhibitor, and to combined vemurafenib and trametinib treatment. Moreover, *BRAF* V600E–mutant SK-Mel-28 cells also showed miR-204-5p and miR-211-5p upregulation after incubation with vemurafenib or with combined vemurafenib and trametinib. The fact that the increased levels of these miRNAs were not observed in cells incubated with AKT or Rac inhibitors suggests that it might represent a specific response to MAPKi.

We studied the impact of miRNA alterations on melanoma resistance to vemurafenib, by ectopic expression of miR-204-5p or miR-211-5p, or by silencing miR-140-3p in parental A375 cells. The data revealed that miR-204-5p and miR-211-5p, but not miR-140-3p, contribute to cell resistance to vemurafenib. Moreover, overexpression of miR-204-5p and miR-211-5p in another *BRAF* V600E melanoma cell line, SK-Mel-28, also conferred vemurafenib resistance. Further supporting the involvement of these miRNAs in vemurafenib resistance, their depletion in A375-VR cells led to decreased cell growth in the presence of vemurafenib. It is noteworthy that as miR-204-5p silencing in inherently vemurafenib-resistant SK-Mel-103 cells does not affect their proliferation in the presence of vemurafenib, the results suggest that inherent resistant cells and *BRAF* V600E cells that have developed vemurafenib resistance behave differently in the context of miR-204-5p involvement. Underlining the miR-204-5p and miR-211-5p contribution to vemurafenib resistance, we show that triple-miR cells exhibit higher *in vivo* resistance to vemurafenib than control cells, resulting in larger tumors in NSG mice.

Notably, overexpression of miR-204-5p and miR-211-5p provided MAPK reactivation during the first 4 weeks of cell exposure to vemurafenib, earlier and on top of that observed in control cells. One of the possible mechanisms behind the increased MAPK reactivation detected in triple-miR cells could be their remarkable enhancement of Ras activation when exposed to vemurafenib. Therefore, based on the fast kinetics of miR-204-5p and miR-211-5p upregulation, the data overall suggest that these miRNAs might provide initial survival advantage supported by their early contribution to maintain sufficient Ras/MEK/ERK activation levels before further activation caused by genetic or nongenetic alterations of components of this pathway lead to resistance to vemurafenib. Furthermore, the reduced viability of A375-VR cells depleted for miR-204-5p and miR-211-5p indicates that these miRNAs facilitate resistance to vemurafenib not only at initial but also at more advanced stages of treatment.

miR-204 is located in the *TRPM3* gene, and we show here that, similar to miR-204-5p, *TRPM3* mRNA expression is also enhanced in A375-VR cells, highlighting early proposal that miR-204 and *TRPM3* have common regulatory mechanisms (32, 33). PAX6 promotes expression of this miRNA (34).

Although we found a strong induction of PAX6 expression in A375-VR cells, the increased miR-204-5p expression was independent of PAX6, as PAX6 silencing did not alter the miRNA levels. On the contrary, knocking down the expression of STAT3, another transcription factor regulating miR-204-5p expression in melanoma (35), led to a significant reduction in the levels of this miRNA in A375-VR cells, suggesting the involvement of STAT3 in the upregulation of miR-204-5p in the vemurafenib-resistant cells.

miR-211 is found in an intron of *TRPM1*, a target gene of MITF, and therefore MITF could indirectly drive miR-211 expression by transcriptionally enhancing *TRPM1* levels (37). A375-VR cells display higher expression of both miR-211-5p and *TRPM1* than parental cells, as well as enhanced MITF activity based on increased TYR expression, together raising the possibility that MITF could contribute to miR-211 upregulation in A375-VR cells. Nevertheless, MITF silencing in resistant cells did not significantly alter the expression of this miRNA, suggesting that MITF plays minor or no roles in the regulation of miR-211-5p expression in A375-VR cells, and that other mechanisms stimulate the expression of this miRNA in these cells.

miR-204 and miR-211 have very similar nucleotide sequences with only two different nucleotides in the whole sequence and the same seed region, a likely explanation for sharing some common targets. Examination of target expression in A375-VR cells and in cells overexpressing miR-204-5p or miR-211-5p revealed that *NUAK1/ARK5*, *EFNB2* and *CHOP* mRNA levels were significantly reduced. However, only NUAK1/ARK5 protein expression was consistently diminished in the vemurafenib-resistant cells and in H-miR-211 and triple-miR transductants. NUAK1 is a kinase related to AMP-activated protein kinase (AMPK) that can be phosphorylated and activated by the tumor suppressor LKB1 (48). Interestingly, LKB1 can be phosphorylated by both ERK and p90RSK in melanoma cell lines harboring the *BRAF* V600E mutation, leading to inhibition of LKB1 binding to and activation of AMPK, and ultimately causing increased cell proliferation (49). It is currently unknown whether the *BRAF* V600E mutation could also lead to LKB1-NUAK1 uncoupling and upregulation of cell growth. The current data open up the possibility that NUAK1 could be involved in vemurafenib resistance in melanoma cells, an hypothesis that will be the focus of future investigations.

Although ephrin B2 is a target for miR-204-5p, its expression did not significantly decrease in A375-VR or in H-miR-204 cells, suggesting no apparent roles for ephrin B2 in resistance to vemurafenib in A375-VR cells. miR-211-5p elicits prosurvival cell responses by downregulating its target gene *CHOP* (42), a proapoptotic transcription factor involved in the unfolded protein response. CHOP mRNA and protein expression was reduced in A375-VR cells, which raised the possibility that it could contribute to early viability against vemurafenib. However, this hypothesis becomes weakened by the reported increase in CHOP expression in melanoma cells exposed to BRAFi (50). It is worth mentioning that *NUAK1/ARK5* and *EFNB2* expression was increased in SK-Mel-103 relative to A375 cells, which might suggest that inherent resistant cells or cells that developed resistance to vemurafenib behave differently in the context of miRNA involvement.

Both oncogenic and tumor suppressor roles have been linked to miR-204-5p and miR-211-5p. Thus, their ectopic expression leads to colorectal and breast cancer cell proliferation (40, 51). In

melanoma, these miRNAs act as tumor suppressors and also inhibit cell invasion (21, 37, 52, 53). This is consistent with our observation of A375-VR *in vitro* cell invasion blockade, which could potentially translate into reduced metastatic capacity. However, parental and A375-VR cells display similar metastatic capacities, and thus our data would not support that the decreased A375-VR cell invasion would result in lower metastasis, at least in later steps of this process. Yet, we do not know whether initial invasion and dissemination events of parental cells might be more efficient than those of vemurafenib-resistant cells. Anyhow, as A375-VR tumors grew faster than parental cell tumors, this suggests that a possible initial lower invasion efficiency of A375-VR cells might be later counteracted by their higher proliferation rate *in vivo*. The involvement of miR-204-5p and miR-211-5p in melanoma resistance to vemurafenib reported here represents a novel function for these miRNAs, and functional identification of their targets will shed mechanistic view of their implication in melanoma resistance. The upregulation of miR-204-5p and miR-211-5p expression could provide early viability in the presence of vemurafenib that might allow subsequent resistance. Our study together with recent work addressing the role of miRNAs in BRAFⁱ resistance of melanoma (23, 24, 54, 55) highlights the contribution of nongenetic alterations in melanoma resistance to BRAFⁱ.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19.
- Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010;467:596–9.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507–16.
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973–7.
- Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011;480:387–90.
- Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* 2012;3:724.
- Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010;468:968–72.
- Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013;19:1401–9.
- Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res* 2014;20:1965–77.
- Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and immune evolution of melanoma acquiring MAPKⁱ resistance. *Cell* 2015;162:1271–85.
- Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature* 2012;482:347–55.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524–9.
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 2010;467:86–90.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828–33.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005;120:635–47.
- Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, et al. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res* 2008;68:1362–8.
- Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1814–9.
- Philippidou D, Schmitt M, Moser D, Margue C, Nazarov PV, Muller A, et al. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma. *Cancer Res* 2010;70:4163–73.
- Gaziel-Sovran A, Segura MF, Di Micco R, Collins MK, Hanniford D, Vega-Saenz de Miera E, et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell* 2011;20:104–18.
- Luo C, Tetteh PW, Merz PR, Dickes E, Abukiwan A, Hotz-Wagenblatt A, et al. miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through down-regulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol* 2013;133:768–75.
- Bell RE, Khaled M, Netanel D, Schubert S, Golan T, Buxbaum A, et al. Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NIAK1. *J Invest Dermatol* 2014;134:441–51.
- Migliore C, Giordano S. Resistance to targeted therapies: a role for microRNAs? *Trends Mol Med* 2013;19:633–42.
- Liu S, Tetzlaff MT, Wang T, Yang R, Xie L, Zhang G, et al. miR-200c/Bmi1 axis and epithelial-mesenchymal transition contribute to acquired resistance to BRAF inhibitor treatment. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28:431–41.
- Sun X, Li J, Sun Y, Zhang Y, Dong L, Shen C, et al. miR-7 reverses the resistance to BRAFⁱ in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Oncotarget* 2016;7:53558–70.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Díaz-Martínez, L. Benito-Jardón, L. Alonso, E. Hernando, J. Teixidó

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Díaz-Martínez, L. Benito-Jardón, L. Alonso, L. Koetz-Ploch, J. Teixidó

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Díaz-Martínez, L. Benito-Jardón, L. Alonso, L. Koetz-Ploch, J. Teixidó

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Díaz-Martínez, L. Benito-Jardón, L. Alonso, E. Hernando, J. Teixidó

Study supervision: E. Hernando, J. Teixidó

Acknowledgments

We thank Nohemi Arellano-Sánchez for expert technical support. Drs. Angeles García-Pardo, Marisol Soengas, Ignacio Casal, Emily Bernstein, Poulidakos Poulidakos, Erica Riveiro-Falkenbach, José Luis Rodríguez-Peralto and Agustín Zapata are acknowledged for providing useful reagents, and Dr. Iván Marquez and Imanol Arozarena for helpful discussions. We also thank Olivia Barcón-Minchán for assistance in the Animal Facility. This work was supported by grants SAF2014-53059-R and RD12/0036/0061 (to J. Teixidó), and NIH/NCI grants R01CA155234-03 and R01CA163891-03 (to E. Hernando).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received May 9, 2017; revised October 3, 2017; accepted December 4, 2017; published OnlineFirst December 11, 2017.

25. Hernandez-Varas P, Colo GP, Bartolome RA, Paterson A, Medrano-Fernandez I, Arellano-Sanchez N, et al. Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) protein controls invasion and growth of melanoma cells. *J Biol Chem* 2011;286:18492–504.
26. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
27. Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 1997;7:986–95.
28. Bartolome RA, Wright N, Molina-Ortiz I, Sanchez-Luque FJ, Teixido J. Activated G(alpha)13 impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer Res* 2008;68:8221–30.
29. Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:441–50.
30. Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, Mahdavi M, Gutschner T, Genovese G, et al. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res* 2014;74:4845–52.
31. Koetz-Ploch L, Hanniford D, Dolgalev I, Sokolova E, Zhong J, Diaz-Martinez M, et al. MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway. *Pigment Cell Melanoma Res* 2017;30:328–38.
32. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* 2011;208:535–48.
33. Hall DP, Cost NG, Hegde S, Kellner E, Mikhaylova O, Stratton Y, et al. TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2014;26:738–53.
34. Shaham O, Gueta K, Mor E, Oren-Giladi P, Grinberg D, Xie Q, et al. Pax6 regulates gene expression in the vertebrate lens through miR-204. *PLoS Genet* 2013;9:e1003357.
35. Vitiello M, Tuccoli A, D'Aurizio R, Sarti S, Giannecchini L, Lubrano S, et al. Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells. *Oncotarget* 2017;8:25395–417.
36. Miller AJ, Du J, Rowan S, Hershey CL, Widlund HR, Fisher DE. Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res* 2004;64:509–16.
37. Levy C, Khaled M, Iliopoulos D, Janas MM, Schubert S, Pinner S, et al. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Mol Cell* 2010;40:841–9.
38. Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 1994;14:8058–70.
39. Margue C, Philippidou D, Reinsbach SE, Schmitt M, Behrmann I, Kreis S. New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion. *PLoS One* 2013;8:e73473.
40. Cai C, Ashktorab H, Pang X, Zhao Y, Sha W, Liu Y, et al. MicroRNA-211 expression promotes colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo by targeting tumor suppressor CHD5. *PLoS One* 2012;7:e29750.
41. Ying Z, Li Y, Wu J, Zhu X, Yang Y, Tian H, et al. Loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype. *Cancer Res* 2013;73:990–9.
42. Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, et al. miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Mol Cell* 2012;48:353–64.
43. Dror S, Sander L, Schwartz H, Sheinboim D, Barzilai A, Dishon Y, et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nat Cell Biol* 2016;18:1006–17.
44. Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 2011;71:2750–60.
45. Shao Y, Aplin AE. Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res* 2010;70:6670–81.
46. Martz CA, Ottina KA, Singleton KR, Jasper JS, Wardell SE, Peraza-Penton A, et al. Systematic identification of signaling pathways with potential to confer anticancer drug resistance. *Sci Signal* 2014;7:ra121.
47. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 2014;508:118–22.
48. Lizzano JM, Goransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 2004;23:833–43.
49. Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan YY, Granter SR, Chin L, et al. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol Cell* 2009;33:237–47.
50. Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014;124:1406–17.
51. Lee H, Lee S, Bae H, Kang HS, Kim SJ. Genome-wide identification of target genes for miR-204 and miR-211 identifies their proliferation stimulatory role in breast cancer cells. *Sci Rep* 2016;6:25287.
52. Mazar J, Qi F, Lee B, Marchica J, Govindarajan S, Shelley J, et al. MicroRNA 211 functions as a metabolic switch in human melanoma cells. *Mol Cell Biol* 2016;36:1090–108.
53. Luan W, Qian Y, Ni X, Bu X, Xia Y, Wang J, et al. miR-204-5p acts as a tumor suppressor by targeting matrix metalloproteinases-9 and B-cell lymphoma-2 in malignant melanoma. *Onco Targets Ther* 2017;10:1237–46.
54. Stark MS, Bonazzi VF, Boyle GM, Palmer JM, Symmons J, Lanagan CM, et al. miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 2015;6:17753–63.
55. Vergani E, Di Guardo L, Dugo M, Rigoletto S, Tragni G, Ruggeri R, et al. Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget* 2016;7:4428–41.

ANEXO II

New insights in melanoma resistance to BRAF inhibitors: a role for microRNAs

Marta Díaz-Martínez, Lucía Benito-Jardón and Joaquín Teixidó

The discovery of the BRAF V600E point mutation as the most frequent genetic alteration in melanoma has focused attention for the past years in the design and improvement of targeted therapy to this mutated BRAF form. Vemurafenib (VMF) and dabrafenib were generated as BRAF V600E specific inhibitors (BRAFi) providing significant therapeutic benefits for melanoma patients. However, the common emergence of drug resistance to MAPK-targeted therapy remains a challenge. Although the most frequent mechanisms involved in BRAFi resistance in melanoma converge in reactivation of the MAPK pathway, a significant portion of tumors displays resistance mechanisms that cannot be accounted for genetic alterations.

Due to the important role of microRNAs (miRNAs) in cancer progression, we recently undertook a study aimed to address the miRNA potential implication in melanoma resistance to BRAFi [1]. After generating A375 BRAF V600E melanoma cells resistant to VMF (A375-VR), we performed small RNA-seq comparing parental and VMF-resistant A375 cells. This led to the identification and validation of several miRNAs differentially expressed between both cell types, finally focusing our analyses on miR-140-3p, which was downregulated, and miR-204-5p and miR-211-5p, whose expression was increased. Changes in expression of these miRNAs in A375 cells exposed to VMF took place rapidly, were stable, and were also detected upon cell treatment with trametinib (TMT) and SCH772984, inhibitors for MEK and ERK, respectively. Furthermore, alterations in the expression of miR-204-5p, miR-211-5p and miR-140-3p were also observed in an additional BRAF V600E melanoma cell line, SK-Mel 28, and were detected in cells incubated with combined VMF and TMT, highlighting the clinical relevance of our observations. Therefore, our findings reveal close functional relationships between MAPK inhibition and changes in miR-204-5p, miR-211-5p and miR-140-3p expression, and are in line with another previous report [2]. When we looked for potential mechanisms responsible for VMF-promoted miR-204-5p and miR-211-5p upregulation, we found a role for the STAT3 transcription factor in the increased miR-204 expression, again supporting previous results [2]. Although PAX6 and MITF expression levels were enhanced by VMF, RNA silencing experiments revealed that these transcription factors did not play important roles in the increased expression of these miRNAs.

Importantly, miRNA silencing and overexpression experiments demonstrated a key role for miR-204-5p and miR-211-5p, but not for miR-140-3p, in early A375 and SK-Mel28 cell resistance to VMF. Moreover, *in vivo* experiments using NSG mice revealed an increase in melanoma resistance to VMF linked to enhanced expression of these miRNAs. Of note, overexpression of miR-204 and miR-211 resulted in durable stimulation of the Ras-MAPK pathway after VMF exposure. Overall, our data strongly suggest that miR-204-5p and miR-211-5p contribute to sustained pErk1/2 levels in initials steps of melanoma resistance to VMF, allowing the later occurrence of further mechanisms to acquire full resistance (Figure 1).

Previous studies have shown the impact of miRNAs in melanoma resistance to BRAFi. Stark *et al* showed that miR-514a overexpression increased melanoma cell resistance to BRAFi, correlating with decreased expression of the tumour suppressor NF1 [3]. Another study found that miR-579-3p is down-regulated in tumour samples from melanoma patients after the development of resistance to targeted therapies. Authors demonstrated that ectopic expression of this miRNA impairs the acquisition of drug resistance in melanoma cells [4]. Vergani *et al* proposed a model in which resistant cells produce increased levels of the CCL2 chemokine, which in turn alters miRNA expression, acting as facilitators of drug resistance [5]. In addition, a role for miR-7 in resistance to BRAFi has been reported. Thus, by using miR-7 mimics, it has been shown that the decreased expression of the miR-7 targets EGFR, IGF-1R and CRAF contribute to the suppression of the MAPK and PI3K/AKT pathways, reversing the melanoma cell resistance to VMF [6].

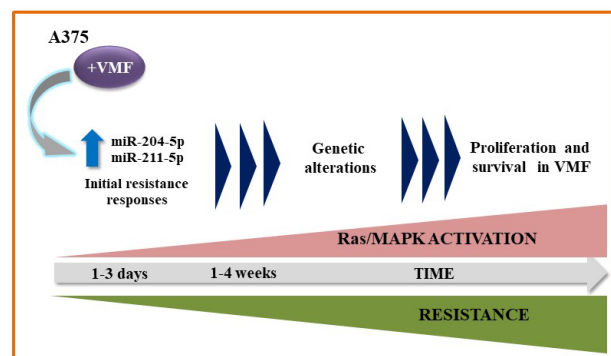


Figure 1: Proposed model for the contribution of miR-204 and miR-211 to VMF resistance in melanoma

Recently, Koetz *et al* reported the upregulation of miR-125a in human melanoma cells and tissues from patients with acquired resistance to BRAFi. In this work, miR-125a was proposed to confer resistance by inhibiting pro-apoptotic components of the intrinsic apoptosis pathway [7]. Finally, a recent study addressed the RNA cargo of tumour-derived extracellular vesicles from melanoma cells after treatment with vemurafenib. It was found that this inhibitor caused changes in the RNA profile, especially an increased expression of miR-211-5p after BRAF inhibition. Furthermore, miR-211-5p transfection in melanoma cells led to increased resistance to VMF, whereas miR-211-5p inhibition in a VMF-resistant cell line reduced the cell proliferation rate [8], in close agreement with our data for the key role of this miRNA in VMF resistance.

Collectively, these results highlight the regulation by miRNAs of BRAFi resistance in melanoma, suggesting a mechanism-based strategy to limit resistance and improve clinical outcomes of melanoma patients.

Marta Díaz-Martínez: Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Molecular Biomedicine, Ramiro de Maeztu 9, Madrid, Spain

Correspondence to: Marta Díaz-Martínez, **email** martadiazmtz@gmail.com

Keywords: miRNA; melanoma; Ras-MAPK pathway; BRAF inhibitors; resistance

Received: June 04, 2018

Published: October 23, 2018

REFERENCES

1. Díaz-Martínez M, et al. Cancer Res. 2018; 78:1017-30.
2. Vitiello M, et al. Oncotarget. 2017; 8:25395-417. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15915>
3. Stark MS, et al. Oncotarget. 2015; 6:17753-63. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3924>
4. Fattore L, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113:E5005-13.
5. Vergani E, et al. Oncotarget. 2016; 7:4428-41. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6599>
6. Sun X, et al. Oncotarget. 2016; 7:53558-70. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10669>
7. Koetz-Ploch L, et al. Pigment Cell Melanoma Res. 2017; 30:328-38.
8. Lunavat TR, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017; 114:5930-9.

Copyright: Díaz-Martínez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ANEXO III

Resistance to MAPK Inhibitors in Melanoma Involves Activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 Pathway

Lucía Benito-Jardón¹, Marta Díaz-Martínez¹, Nohemi Arellano-Sánchez¹, Paloma Vaquero-Morales¹, Azucena Esparís-Ogando², and Joaquín Teixidó¹



Abstract

Combined treatment of metastatic melanoma with BRAF and MEK inhibitors has improved survival, but the emergence of resistance represents an important clinical challenge. Targeting ERK is a suitable strategy currently being investigated in melanoma and other cancers. To anticipate possible resistance to ERK inhibitors (ERKi), we used SCH772984 (SCH) as a model ERKi to characterize resistance mechanisms in two BRAF V600E melanoma cell lines. The ERKi-resistant cells were also resistant to vemurafenib (VMF), trametinib (TMT), and combined treatment with either VMF and SCH or TMT and SCH. Resistance to SCH involved stimulation of the IGF1R-MEK5-Erk5 signaling pathway, which counteracted inhibition of Erk1/2 activation and cell growth. Inhibition of IGF1R with linsitinib blocked Erk5 activation in SCH-resistant cells and decreased their growth in 3D spheroid growth assays as

well as in NOD scid gamma (NSG) mice. Cells doubly resistant to VMF and TMT or to VMF and SCH also exhibited down-regulated Erk1/2 activation linked to stimulation of the IGF1R-MEK5-Erk5 pathway, which accounted for resistance. In addition, we found that the decreased Erk1/2 activation in SCH-resistant cells involved reduced expression and function of TGF α . These data reveal an escape signaling route that melanoma cells use to bypass Erk1/2 blockade during targeted melanoma treatment and offer several possible targets whose disruption may circumvent resistance.

Significance: Activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 signaling pathway opposes pharmacologic inhibition of Erk1/2 in melanoma, leading to the reactivation of cell proliferation and acquired resistance.

Introduction

Mutations acquired by melanocytes during malignization to melanoma are responsible for the hyperactivation of the MAPK and the PI3K/Akt pathways (1, 2). Genetic alterations in BRAF are the most frequent (50%–70%) activating mutations in melanoma, whereas NRAS mutations, especially at Q61, are also frequent (15%–30%; refs. 1, 3). The BRAF V600E mutation is the most prevalent alteration in malignant melanoma, and combined with loss of PTEN causes tumor transformation and metastatic progression (4). The BRAF V600E alteration was the focus for the development of BRAF inhibitors (BRAFi), including vemurafenib (VMF) and dabrafenib (5–7), which have provided substantial benefits for patients with metastatic melanoma, especially when combined with the MEK1/2 inhibitor (MEKi) trametinib (TMT). However, a major challenge in melanoma treatment with MAPK inhibitors (MAPKi) is an almost universal resistance leading to disease relapse. Frequent mechanisms involved in MAPKi

resistance of melanoma converge in the reactivation of the BRAF-MEK-ERK pathway usually following NRAS mutations (8), alterations in BRAF splicing (9), and BRAF amplification (10, 11), as well as in the activation of the PI3K-Akt signaling (12). Therefore, there is a need for alternative therapies to improve melanoma treatment.

Given the linearity of the Ras-MAPK pathway, targeting ERK itself represents a suitable strategy that is currently being investigated in several clinical trials in melanoma and other cancer types (13). An additional advantage for targeting ERK is based on the fact that resistance to BRAFi or MEKi frequently involves the relief of negative feedback mechanisms causing Erk1/2-dependent MAPK pathway reactivation. These facts validate the use of ERK inhibitors (ERKi) to counterbalance the resistance to BRAFi and MEKi.

Inhibitors for Erk1/2, either as monotherapy, in combination with BRAFi, or administered after the onset of resistance, have been recently developed (13–16). A group of these ERKi were termed "dual mechanism" inhibitors, as they both block MEK-dependent Erk1/2 phosphorylation at the TEF motif, thus preventing the generation of active Erk1/2 conformations, and inhibit the intrinsic Erk1/2 catalytic activity (13). For example, studies with SCH772984 (SCH), a dual-mechanism ERKi, indicate that the MAPK pathway could be blocked at three different levels, and remarkably, SCH inhibits the growth of cells resistant to BRAFi and MEKi (14). SCH displays nanomolar potency in tumor cells bearing mutations in BRAF, NRAS, or KRAS (14, 17). Moreover, it induces tumor regression in xenograft models in different cancer types, acts synergistically with VMF to inhibit melanoma cell growth, and delays the onset of acquired

¹Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain. ²Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-University of Salamanca, IBSAL, and CIBERONC, Salamanca, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Joaquín Teixidó, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone 34-91-8373112; Fax 34-91-5360432; E-mail: joaquin@ Cib.csic.es

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2762

©2019 American Association for Cancer Research.

resistance (13, 14). An oral SCH clinical analogue called MK-8353 and the ATP-competitive ERKi ulixertinib were recently tested in preclinical/phase I stage in patients with advanced solid tumors (18, 19). Both agents were well tolerated and displayed reasonable antitumor activity, opening the way for future studies.

In the possible expectation of clinical resistance to ERKi, we have used SCH as a model to develop melanoma cells resistant to ERKi and characterized molecular mechanisms accounting for resistance. The results could anticipate likely resistance responses and might facilitate the search for improved inhibitors of the MAPK pathway.

Materials and Methods

Cells, reagents, and antibodies

The human melanoma cell lines A375 and SK-Mel 28 were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS (Gibco; complete medium). The human melanoma cell line A375 was latest authenticated in August 2017 at Secugen by short tandem repeat analysis. The SK-Mel-28 cell line was a gift from Dr. Marisol Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid; April 2014) and was not authenticated in our laboratory. All cell lines were used within 5 to 50 passages of thawing the original stocks and were tested every 3 months for mycoplasma contamination. A375-ER and SK-Mel 28-ER cells were derived from their respective parental cells by sequential increases of SCH up to 200 nmol/L and were finally maintained as an uncloned resistant cell population in complete medium with 200 nmol/L of the ERK inhibitor. We also obtained A375 and SK-Mel 28 cells double-resistant to VMF (1 μ mol/L) and TMT (50 nmol/L; A375-VR/TR, SK-Mel 28-VR/TR), or to VMF (1 μ mol/L) and SCH (200 nmol/L; A375-VR/ER, SK-Mel 28-VR/ER). To obtain SCH-resistant clones, parental A375 cells were cultured in the presence of SCH (200 nmol/L), and upon 3 weeks, resistant clones were picked up and kept in complete medium with 200 nmol/L SCH. The inhibitors SCH727984, VMF, TMT, BIX02189, linsitinib, triciribine, and palbociclib were from Selleckchem. Cycloheximide was from Sigma Aldrich. Anti-Erk1/2, phospho-Erk1/2, Akt, phospho-Akt (Ser473), phospho-p90RSK (Thr359/Ser363), phospho-Erk5 (Thr218/Tyr220), phospho-IGF-I Receptor β (Tyr1131), Cdk4, and Cdk6 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. The antibody against the C-terminal domain of Erk5 (anti-Erk5) has been previously characterized (20). Anti-MEK1 and IGF-1R β antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, and phospho-MEK1/2 (S218/S222) and pan-Ras antibodies were from Millipore. Antibodies to BRAF and Cdk2 were purchased from Abcam, and p90RSK, Cyclin D1, and Rb from BD Biosciences. β -Actin and vinculin antibodies were obtained from Sigma Aldrich, anti-HA.11 Epitope Tag antibody was from Biolegend, and anti-c-myc from Novus Biologicals. TGF α was from StemCell Technologies, and VEGF from Peprotech.

Vectors, lentiviral-mediated gene transfer, and siRNA transient transfections

Lentiviral pLKO.1 vectors carrying Erk5 shRNA or control shRNA were used for stable silencing of gene expression (21). For virus production, HEK-293FT cells were transfected with pLKO vectors, pRSV/Rev, pMDLg/pRRE, and pMDG/vsv using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Viruses were collected and filtered 48 hours after transfection, and infection of A375-ER cells

was performed for 72 hours using polybrene (Millipore). Transductants were selected with puromycin (1 μ g/mL; Millipore). siRNAs were transfected using Interferin (Polyplus Transfection), following the manufacturer's instructions. Cdk4 ON-TARGET plus SMART pool siRNA was purchased from Dharmacon. Sequences for Cdk2, Cdk6, and control siRNA (Sigma-Aldrich) are provided in Supplementary Table S1A. By site-directed mutagenesis of the human MEK5 cDNA, the Ser³¹¹ and Thr³¹⁵ residues were changed to Ala, and then the MEK5-AA cDNA was subcloned into the pcDNA3.1-HA vector, finally generating the pcDNA3.1-HA-MEK5-AA expression vector. Vectors were transfected using JetPrime (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's protocols.

Cell proliferation and viability assays

For long-term proliferation assays, 200 cells were seeded in complete medium in quadruplicates into 96-well plates. After treatments with different inhibitors, 5 μ L of CCK8 reagent (Sigma-Aldrich) were added for 2 hours, and absorbance was subsequently measured at 450 nm with Multiskan Bichromatic microplate reader (Labsystems). For 48- and 72-hour viability assays, 5,000 and 2,000 cells, respectively, were seeded in triplicates the day before treatment. Finally, 10 μ L of MTT reagent (Sigma-Aldrich; 5 mg/mL) was added for 1.5 hours, following by solubilization using DMSO and plate reading at 540 nm.

Western blotting and GTPase assays

Following cell lysis (22), proteins were resolved by SDS/PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected by chemiluminescence. Densitometry of the resulting bands was performed using ImageJ software. GTPase assays to detect the active forms of Ras were performed as described (22), using GST-RAF-RBD and immunoblotting with anti-Ras antibodies.

Receptor tyrosine kinase and growth factor arrays

To assess relative levels of phosphorylation of a set of receptor tyrosine kinases (RTK) in A375 and A375-ER cells, we used a human phospho-RTK array kit (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. To determine differences in secreted growth factors in A375 and A375-ER, Human Growth Factor Antibody Array-Membrane (Abcam) was used. Dots from blots were quantified using the ImageJ software.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted using TriReagent (Sigma Aldrich) following standard methods. For mRNA expression analyses, reverse transcription was performed using M-MLV-RT (Promega), and qPCR was performed using FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Assays were performed in triplicate, and results normalized for the expression levels of GAPDH. Quantitative PCR was analyzed using the LightCycler 480 (Roche). Oligonucleotide sequences are provided in Supplementary Table S1B.

3D spheroid growth assay

For melanosphere formation, Cultrex 3-D Spheroid Colorimetric Proliferation/Viability Assay kit (R&D Systems) was used, following the manufacturer's instructions. Briefly, 2,000 cells were plated in 3D culture-qualified 96-well spheroid formation plate in the presence of ECM proteins. Spheroids were formed by 48 hours, and then treatments started (day 0) and continued for 4 to 5 days. Melanospheres were photographed every 24 hours with

a Leica MZ16 F stereomicroscope, and sphere areas were determined using ImageJ software. At the end of the experiments, cell viability was determined using the provided MTT reagent.

Animal studies

For xenografting studies, we followed the described method (23). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee approved the protocols used for experiments with mice. Briefly, NOD/SCID/IL2gR^{-/-} (NSG) mice were subcutaneously inoculated with 3×10^6 control shRNA or shErk5 A375-ER cells in 0.2 mL PBS. Subcutaneous tumor growth was inspected and tumor volumes were measured every 2 to 3 days until day 30, when all mice were sacrificed. For experiments involving linsitinib administration, 3×10^6 A375 or A375-ER cells were subcutaneously injected. When tumor volumes reached between 50 and 100 mm³, NSG mice were randomly divided in two groups and daily treated with linsitinib (LC Laboratories; 40 mg/kg) or vehicle (25 mmol/L tartaric acid), by oral gavage for 2 weeks. Linsitinib was formulated every day at 4 mg/mL in

25 mmol/L tartaric acid. Tumor volume was measured 3 times per week.

Statistical analyses

Data were analyzed by the Student *T* test. In all analyses, the minimum acceptable level of significance was $P < 0.05$.

Results

Characterization of SCH772984-resistant melanoma cells

As previously reported (14), parental A375 (BRAF V600E) cells were sensitive to SCH (Fig. 1A). For generation of SCH-resistant cells, cultures were subjected to sequential increases of SCH from initial 5 nmol/L, reaching full resistance at 200 nmol/L (A375-ER, Erk inhibitor resistant), and showing partial resistance at 1 μ mol/L SCH (Fig. 1A). A375-ER cells growing at 1 to 2 μ mol/L SCH displayed a subpopulation of detached apoptotic cells (25%–35%), and therefore, we characterized them from cultures kept at 200 nmol/L of SCH. A375-ER cells maintained for 2 weeks without SCH and then replated in the presence of the ERKi

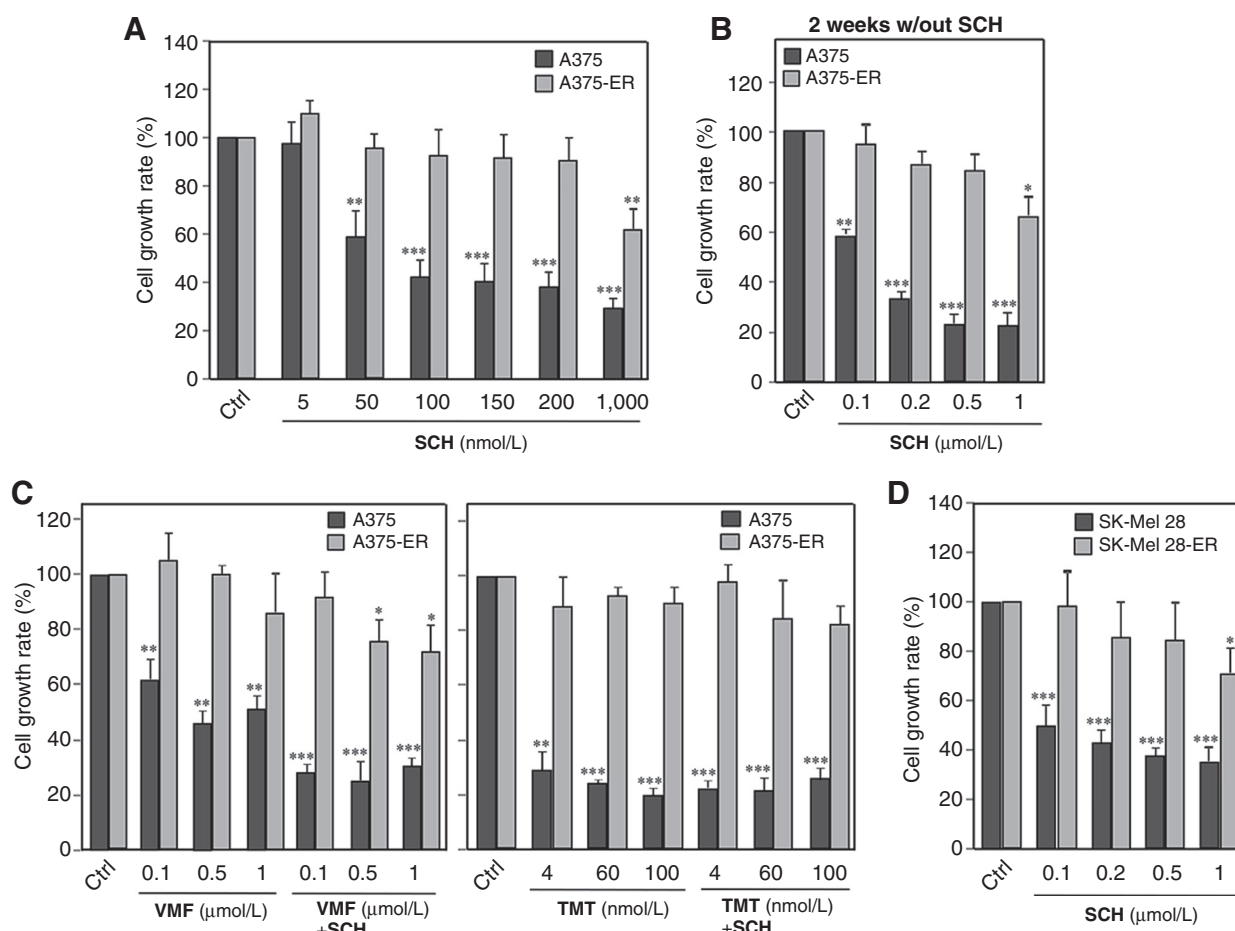


Figure 1.

Characterization of SCH772984-resistant, BRAF V600E melanoma cells. **A**, Cells were tested in MTT assays (48 hours) in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations of SCH ($n = 4$). **B**, Cells were cultured for 2 weeks without SCH and subsequently subjected for 48 hours to MTT assays ($n = 3$). **C**, Growth rates of parental and SCH-resistant cells in the absence or presence of VMF, TMT, or combined VMF and SCH or TMT and SCH were determined in MTT tests ($n = 3$). **D**, Parental and SCH-resistant SK-Mel 28 cells were tested in MTT assays as in **A** ($n = 4$). Data are referred to control untreated (Ctrl) samples (100%; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.001$).

retained resistance (Fig. 1B), indicating that they were not addicted to the continuous presence of SCH to remain resistant. In addition to SCH, A375-ER cells displayed resistance to the Erk2 inhibitor Vx-11e (ref. 13; Supplementary Fig. S1A). A375-ER cells were also predominantly resistant to VMF, TMT, and to the combinations of SCH with VMF or TMT (Fig. 1C). We also generated resistant cultures of the BRAF V600E melanoma cell line SK-Mel 28 displaying higher than 85% cell growth between 200 and 500 nmol/L of SCH compared with untreated cells (SK-Mel 28-ER; Fig. 1D), and they were also resistant to Vx-11e (Supplementary Fig. S1B). We previously reported that VMF-resistant (VR) A375 cells exhibit partial resistance to SCH (23), and we show here that cells double-resistant to VMF and TMT (A375-VR/TR) or to VMF and SCH (A375-VR/ER and SK-Mel 28-VR/ER) display resistance to the ERKi (Supplementary Fig. S1C and S1D).

Phosphorylation of Erk1/2 and its downstream effector RSK was inhibited in parental A375 and SK-Mel 28 cells treated with SCH (Fig. 2A–C). Basal Erk1/2 and RSK phosphorylation in SCH-resistant cells was strongly reduced compared with parental cells,

and treatment with SCH further decreased their pErk1/2 levels (Fig. 2A–C). In addition, pMEK1/2 was diminished in the resistant cells, even if total MEK1 levels were enhanced, especially in A375-ER cells (Fig. 2B and C; Supplementary Fig. S1E). Down-regulated pErk1/2 was also detected in A375 cells that were partially resistant to 2 μ mol/L of SCH (Supplementary Fig. S1F). Together, these data indicate that, contrary to parental cells, SCH-resistant cells can survive and grow with minimal Erk1/2 activation.

A375-ER and SK-Mel 28-ER cells exhibited higher Ras activation than their parental counterparts, and treatment of A375 cells with SCH already caused Ras activation (Fig. 2D). The expression levels of SPRED1, a suppressor of Ras–MAPK activation, were similar in A375 and A375-ER cells, whereas higher SPRED1 amounts were detected in SK-Mel 28-ER than in SK-Mel 28 cells (Supplementary Fig. S1G). These data suggest that upregulated Ras activation in SCH-resistant cells is mostly independent of a potential decreased SPRED1 activity. Higher BRAF amounts were also found in A375-ER and SK-Mel 28-ER cells than in their parental counterparts, as well as in A375-VR/TR and A375-VR/ER

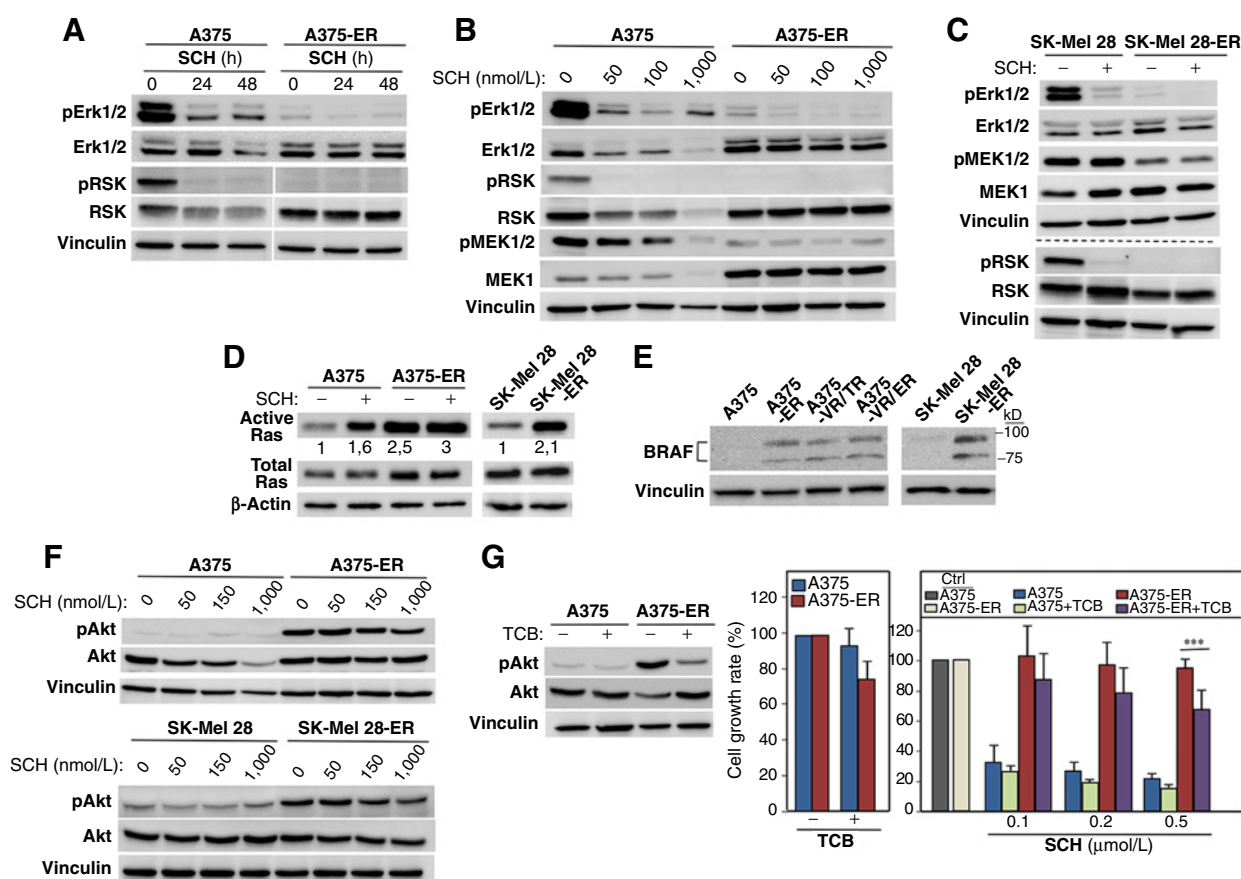


Figure 2.

Analysis of Ras–MAPK and PI3K/Akt activation in SCH-resistant cells. **A–C**, Cells were incubated without or with SCH (**A** and **C**, 200 nmol/L; **B** and **C**, 48 hours) and subsequently tested by immunoblotting using antibodies to the indicated proteins. **D**, Cells were subjected to Ras GTPase assays for detection of active Ras (SCH 200 nmol/L; 48 hours). Numbers under gels represent densitometric quantification of gel bands. **E** and **F**, Cells were analyzed by immunoblotting to test BRAF, pAkt, and total Akt expression. **G**, Cells were treated without or with triciribine (TCB; 1 μ mol/L for 48 hours) and analyzed by immunoblotting (left). Cells were tested in MTT assays (48 hours) without or with TCB (1 μ mol/L; middle) or in the presence of SCH alone or combined with 1 μ mol/L TCB (right). Data are referred to untreated (Ctrl) samples (100%; $n = 4$; ***, $P < 0.001$). Control loading in immunoblottings was assessed with anti-vinculin or anti- β -actin antibodies.

cells (Fig. 2E). A possible mechanism for increased BRAF expression in SCH-resistant cells could be based on the observed BRAF amplification detected in patient-derived tumor xenografts treated with SCH (24). Sequence analyses on the SCH-resistant cells showed no mutations at Erk1 G186 or Erk2 G169 and Q105, which were shown to confer ERKi resistance (25, 26). Moreover, no mutations at N-Ras G12 and Q61 were found.

Analysis of Akt phosphorylation to determine the activation status of the PI3K/Akt pathway revealed higher pAkt in SCH-resistant than in parental cells (Fig. 2F). Increased Akt phosphorylation was linked to decreased PTEN amounts in A375-ER but not in SK-Mel 28-ER cells (Supplementary Fig. S1H). Although the Akt inhibitor triciribine (TCB) decreased by 85% the pAkt levels in A375-ER cells (Fig. 2G, left), it only caused a small decrease in their growth rate (Fig. 2G, middle). When TCB and SCH were combined, there was a modest reduction in A375-ER cell growth at high SCH concentrations compared with SCH alone (Fig. 2G, right), but cells remained mostly resistant, revealing minor roles for the activated PI3K–Akt pathway in the resistance to SCH.

Cdk4, Cdk6, and Cdk2 expression was higher in A375-ER than in A375 cells, both with and without SCH (Fig. 3A). Furthermore, Cyclin D1 expression was preserved in SCH-treated A375-ER cells compared with the reduction seen in A375 cells (Fig. 3A), and higher Cyclin E1 levels were found in A375-ER cells (Supplementary Fig. S1I). Given the overexpression of Cdk4 and Cdk6 in A375-ER cells, we tested their potential involvement in resistance to SCH by using palbociclib, a Cdk4 and Cdk6 inhibitor. Palbociclib reduced the growth of A375 cells and decreased their Rb phosphorylation consistent with Cdk4 and Cdk6 inhibition (Fig. 3B, top and bottom). Significant A375-ER cell growth inhibition was only observed from concentrations of palbociclib of 5 $\mu\text{mol/L}$, but the degree of inhibition was similar to that displayed by A375 cells. Basal pRb levels in A375-ER cells were lower than in A375 cells, but phosphorylation remained unaltered in the resistant cells with increasing palbociclib concentrations (Fig. 3B, bottom), suggesting that their palbociclib-triggered growth inhibition was independent of changes in Rb phosphorylation.

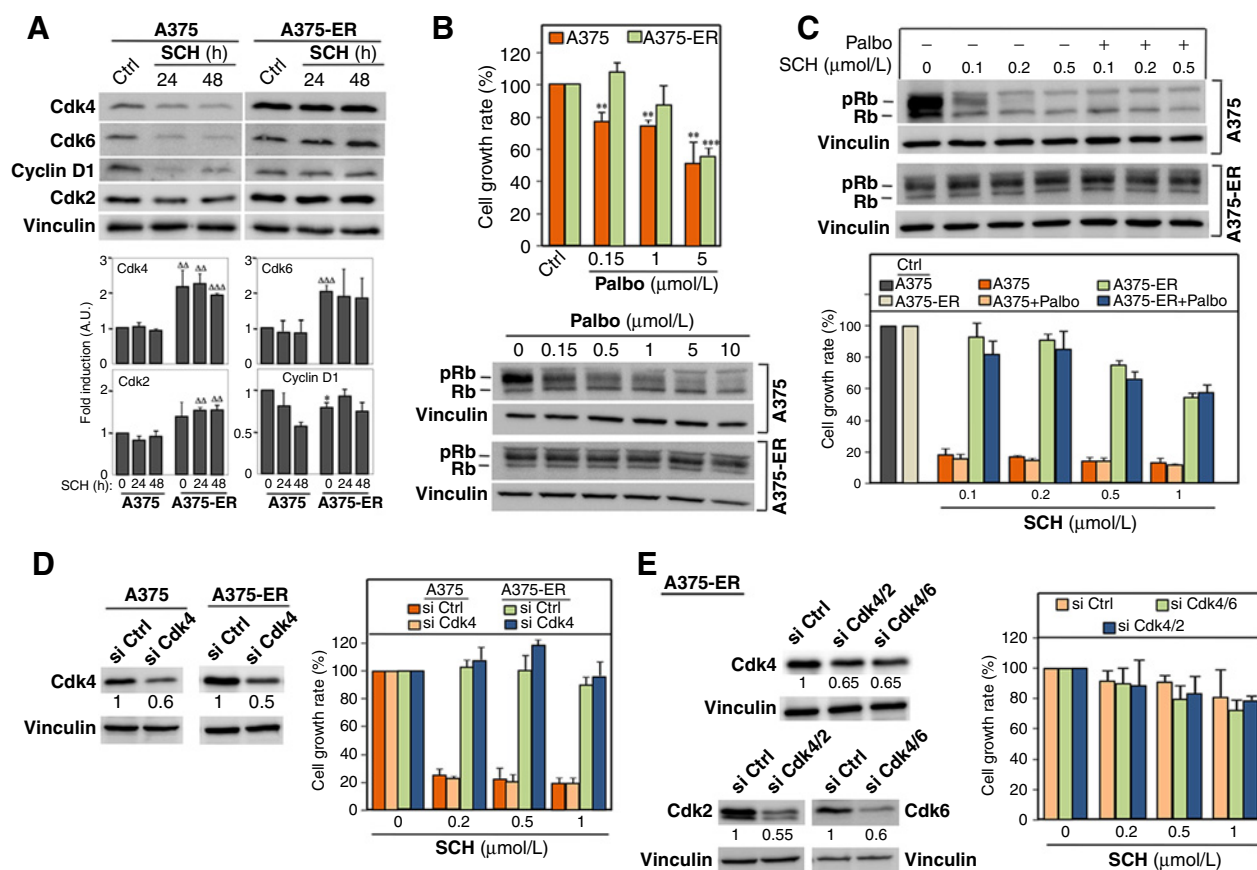


Figure 3.

Resistance to SCH is independent of upregulated Cdk4, Cdk6, and Cdk2 expression in A375-ER cells. **A**, Cells were treated for the indicated times with SCH (200 nmol/L), and expression of cell-cycle proteins was analyzed by immunoblotting. Bottom plots depict densitometric analyses of protein gel bands showing the mean \pm SD of four independent experiments. Expression was significantly enhanced (AAA , $P < 0.001$ and AA , $P < 0.01$) or decreased (* , $P < 0.05$). **B**, MTT assays (72 hours, top) or immunoblotting (bottom) were performed with cells treated with the indicated palbociclib (Palbo) concentrations ($n = 3$; ** , $P < 0.01$; *** , $P < 0.001$). **C**, Top, cells were exposed for 72 hours to different SCH concentrations with or without palbociclib (1 $\mu\text{mol/L}$) and subjected to immunoblotting. Bottom, cells were tested in MTT assays (72 hours) in the presence of SCH alone or combined with palbociclib (1 $\mu\text{mol/L}$). Data are referred to untreated (Ctrl) samples (100%; $n = 4$). **D** and **E**, Cells were transfected with the indicated siRNAs, expression of the cyclin-dependent kinases analyzed by immunoblotting, and transfectant growth tested in MTT assays ($n = 3-4$). Numbers under gels represent densitometric quantification of gel bands.

SCH alone blocked pRb in A375, but not in A375-ER cells even in combination with palbociclib (Fig. 3C, top). Consistently, palbociclib did not influence A375-ER cell resistance to SCH (Fig. 3C, bottom). Moreover, Cdk4 silencing or combined Cdk4-Cdk6 knockdown did not reduce the growth rates of A375-ER transfectants in the presence of SCH, as compared with control transfectants (Fig. 3D and E). We also silenced Cdk2 in combination with Cdk4 in A375-ER cells and found no alterations in the transfectant growth relative to control siRNA counterparts exposed to SCH (Fig. 3E). These results suggest that increased Cdk4, Cdk6, and Cdk2 expression likely facilitates the

cell-cycle progression of A375-ER cells, but these kinases are not responsible for resistance to the ERKi.

BRAF V600E melanoma cell resistance to SCH772984 involves MEK5-Erk5 activation

We next tested whether activation of alternative MAPK pathway in SCH-resistant cells could compensate for blockade of Erk1/2 activation and provide resistance to SCH. Recent data showed that human melanoma tissues express Erk5 (MAPK7/BMK1) and revealed a close association between oncogenic BRAF expression and Erk5 activation (27). As MEK5 phosphorylates the T²¹⁸EY²²⁰

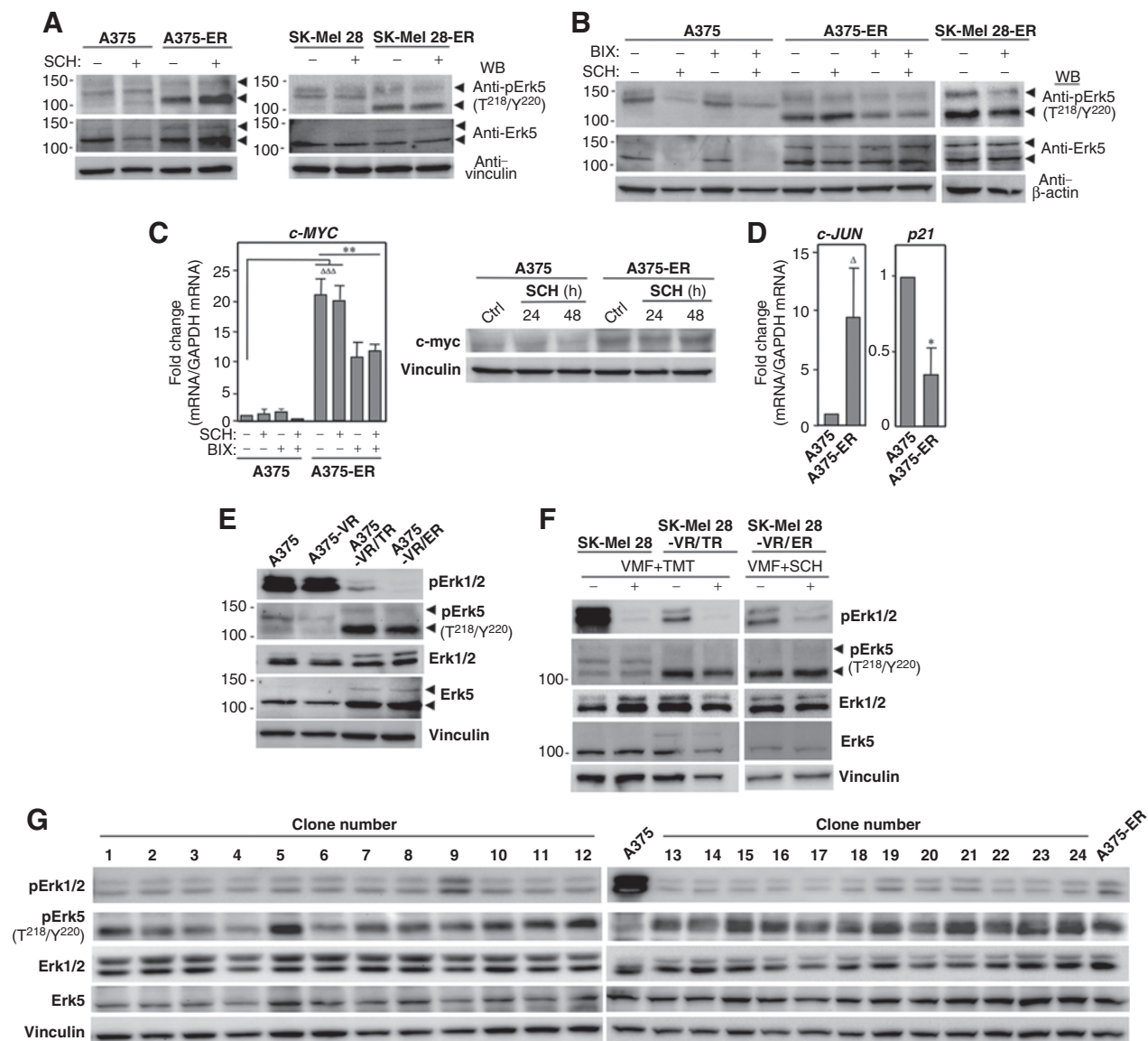


Figure 4.

Upregulated Erk5 activation in MAPKi-resistant melanoma cells. **A** and **B**, Cells were incubated for 48 hours without or with SCH (200 nmol/L) and BIX (5 μmol/L), as indicated, and subjected to immunoblotting. **C**, Cells exposed to SCH (200 nmol/L, 48 hours) with or without BIX (5 μmol/L) were tested by qPCR (left) or by immunoblotting (right) for c-myc expression. Expression was significantly increased ($\Delta\Delta\Delta$, $P < 0.001$) or reduced ($**$, $P < 0.01$; $n = 3$). **D**, Cells were analyzed by qPCR for c-JUN or p21 expression (Δ , $P < 0.05$; $*$, $P < 0.05$; $n = 4$). **E** and **F**, Single- and double-resistant cells were tested by immunoblotting (VMF 1 μmol/L; TMT 50 nmol/L). **G**, Different A375-ER clones, or A375 and A375-ER cells were analyzed by immunoblotting.

motif of Erk5, we used an anti-phospho-Erk5 (T²¹⁸/Y²²⁰) antibody to examine MEK5-dependent Erk5 phosphorylation. This antibody mainly recognized in SCH-resistant cells a product migrating at 110 to 115 kD and to a lesser extent a form of 140 kD, whose levels were not significantly affected by SCH (Fig. 4A). An antibody against the C-terminal domain of Erk5 (anti-Erk5; ref. 20) reacted with the 110 to 115 kD product in parental and resistant cells, as well as to a lesser degree with the 140 kD form in the resistant cells. Notably, the MEK5 inhibitor BIX02189 (BIX) decreased the 110 to 115 kD and 140 kD phosphorylation levels in A375-ER and SK-Mel 28-ER cells (Fig. 4B). A BIX-insensitive 130 kD specie was also detected with the anti-phospho-Erk5 antibody in A375 cells (Fig. 4A and B), but it was not recognized by the anti-Erk5 antibody, suggesting that it might represent a nonspecific band. Therefore, these results indicate that the 110 to 115 kD product is the MEK5-phosphorylated Erk5, whereas the 140 kD form represents the fully phosphorylated Erk5 specie. In support of upregulation of MEK5-dependent Erk5 phosphorylation in A375-ER cells, increased expression of the downstream Erk5 effector c-myc (28) was found, which was sensitive to BIX (Fig. 4C). Furthermore, the levels of c-JUN, an additional effector of activated Erk5 (28), were enhanced in A375-ER cells, whereas we detected reduced amounts of p21, whose expression is also Erk5-regulated (ref. 29; Fig. 4D). As shown above (Fig. 3A), the expression of cyclin D1, another Erk5-downstream effector (30), is also higher in SCH-exposed A375-ER than in A375 cells.

Although A375-VR cells (23) maintained high pErk1/2 and very low pErk5 levels, A375-VR/TR and A375-VR/ER cells showed pErk1/2 inhibition associated with upregulated pErk5 (Fig. 4E). Similarly, SK-Mel 28-VR/TR and SK-Mel 28-VR/ER cells exhibited a remarkable induction of pErk5 relative to parental cells, as well as reduced pErk1/2 amounts (Fig. 4F). Examination of 24 different SCH-resistant A375 clones revealed that all have lower pErk1/2 than parental cells, whereas 22 of 24 displayed higher pErk5 than parental counterparts (Fig. 4G). These data strongly suggest that inhibition of Erk1/2 activation associated with enhanced Erk5 activation by SCH treatment is a wide A375 cellular response which does not arise from the outgrowth of few clones.

Next, we used BIX to determine whether it could counteract cell resistance against SCH. A375 cells were sensitive to BIX alone, supporting recent data (27), although they were more susceptible to growth inhibition by SCH (Fig. 5A–C). Correlating with their activated MEK5–Erk5 signaling, A375-ER cells were more sensitive to BIX alone than parental cells (Fig. 5A and C). In addition, A375-ER and SK-Mel 28-ER cells displayed clear sensitivity to combined SCH and BIX treatment (Fig. 5B). Supporting the involvement of the MEK5–Erk5 pathway in resistance to SCH, decreased pErk5 levels following expression of an HA-tagged MEK5 dominant-negative form (HA-MEK5-AA) in SCH-resistant cells correlated with a significant reduction in the transfectant proliferation, both with and without SCH, as compared with control transfectants (Fig. 5D). Moreover, lentivirally mediated Erk5 silencing in A375-ER cells significantly lowered the transductant proliferation relative to control shRNA cells, or compared with shErk5 transductants displaying reduced Erk5 knockdown (Fig. 5E and F). Furthermore, Erk5-silenced A375-ER cells exhibited a remarkable growth reduction in subcutaneously inoculated NSG mice relative to control shRNA cells (Fig. 5G). In addition, A375-VR/TR and A375-VR/ER cells displayed high sensitivity to BIX alone, which further increased when BIX was combined with

either VMF and TMT or VMF and SCH (Fig. 5H). These results indicate that enhanced MEK5–Erk5 activation in single- and double-resistant cells correlates with high sensitivity to inhibition of this pathway, revealing that its activation is responsible for cell resistance.

Upregulated IGF1R tyrosine kinase activity in resistant cells accounts for Erk5 activation and for resistance to MAPKi

RTKs represent upstream regulators of the MEK5–Erk5 pathway (28, 31). We performed phospho-RTK arrays looking for possible differences between A375 and A375-ER cells which could mediate the enhanced MEK5–Erk5 activation in the resistant cells. The results revealed that the activity of several RTKs including ErbB2, IGF1R, insulin receptor, ALK, and Dtk was higher in A375-ER cells than parental cells, whereas EGFR and Axl activity was reduced (Fig. 6A; Supplementary Fig. S2A, left). The activity of other RTKs was also altered in A375-ER cells, such as ErbB4, FGFR3, and c-Ret, but their activities remained low (Supplementary Fig. S2A, right). Given the strong upregulation of ErbB2 in A375-ER cells, we used the ErbB2 inhibitors lapatinib (LPT) and trastuzumab (TzM) to study a potential ErbB2 involvement in resistance to SCH. The cell growth rate of parental and SCH-resistant cells was not significantly affected by LPT alone at concentrations up to 1 μ mol/L (Supplementary Fig. S2B). In addition, no remarkable cell growth differences between parental and resistant cells were detected in LPT and SCH combined treatments (Supplementary Fig. S2C). Similarly, nonsignificant minor reductions in the growth of A375 and A375-ER cells in response to TzM alone were observed, and no cell growth differences were found in TzM and SCH combinations (Supplementary Fig. S2D). These results suggest that SCH resistance was mostly independent of augmented ErbB2 kinase activity.

IGF-1 contributes to proliferation and survival of melanoma cells (32, 33). Immunoblotting analyses revealed that the increased IGF1R kinase activity detected in the RTK arrays was associated with higher IGF1R expression and IGF1R tyrosine phosphorylation at Tyr¹¹³¹ in SCH-resistant cells than in their parental counterparts (Fig. 6B, top). Furthermore, upregulated IGF1R expression and IGF1R pTyr¹¹³¹ was also found in VMF/TMT- and VMF/SCH-resistant cells. Increased IGF1R protein expression in A375-ER cells correlated with enhanced *IGF1R* mRNA, but no significant changes in *IGF1R* mRNA levels were observed between parental and SCH-resistant SK-Mel 28 cells (Supplementary Fig. S3A). Examination of protein stability revealed higher IGF1R protein amounts upon treatment with cycloheximide in A375-ER and SK-Mel 28-ER cells than in the parental cells (Fig. 6B, middle and bottom), strongly suggesting that upregulated IGF1R expression in SCH-resistant cells is contributed by its higher stability. As expression of IGF1R protein was reported to be regulated by BRAF (34), and we have detected higher BRAF amounts in SCH-resistant cells, we silenced BRAF in A375-ER cells and subsequently tested IGF1R expression. Western blotting revealed that IGF1R levels remained mainly unchanged 48 to 72 hours after transfection (Supplementary Fig. S3B), suggesting that enhanced IGF1R expression is independent of their increased BRAF expression.

Linsitinib (LST), an IGF1R inhibitor, blocked pTyr¹¹³¹ of IGF1R and also reduced (35%–45%; $n = 4$) Ras activation in A375-ER cells (Fig. 6C). Interestingly, MTT assays revealed that A375-ER and SK-Mel 28-ER cells have higher sensitivity to LST alone than parental cells (Fig. 6D). Moreover, A375-ER as well as A375-VR/TR

and A375-VR/ER cells displayed lower growth in 3D spheroid assays in the presence of LST than parental cells, both in terms of sphere size and associated viability (Fig. 6E; Supplementary Fig. S3C and S3D). Notably, combined LST and SCH treatment further

reduced resistance relative to single SCH exposure (Fig. 6F; Supplementary Fig. S4A). In addition, double-resistant A375 cells displayed strong growth inhibition when exposed to LST alone or combined with VMF and TMT, or with VMF and SCH (Fig. 6G).

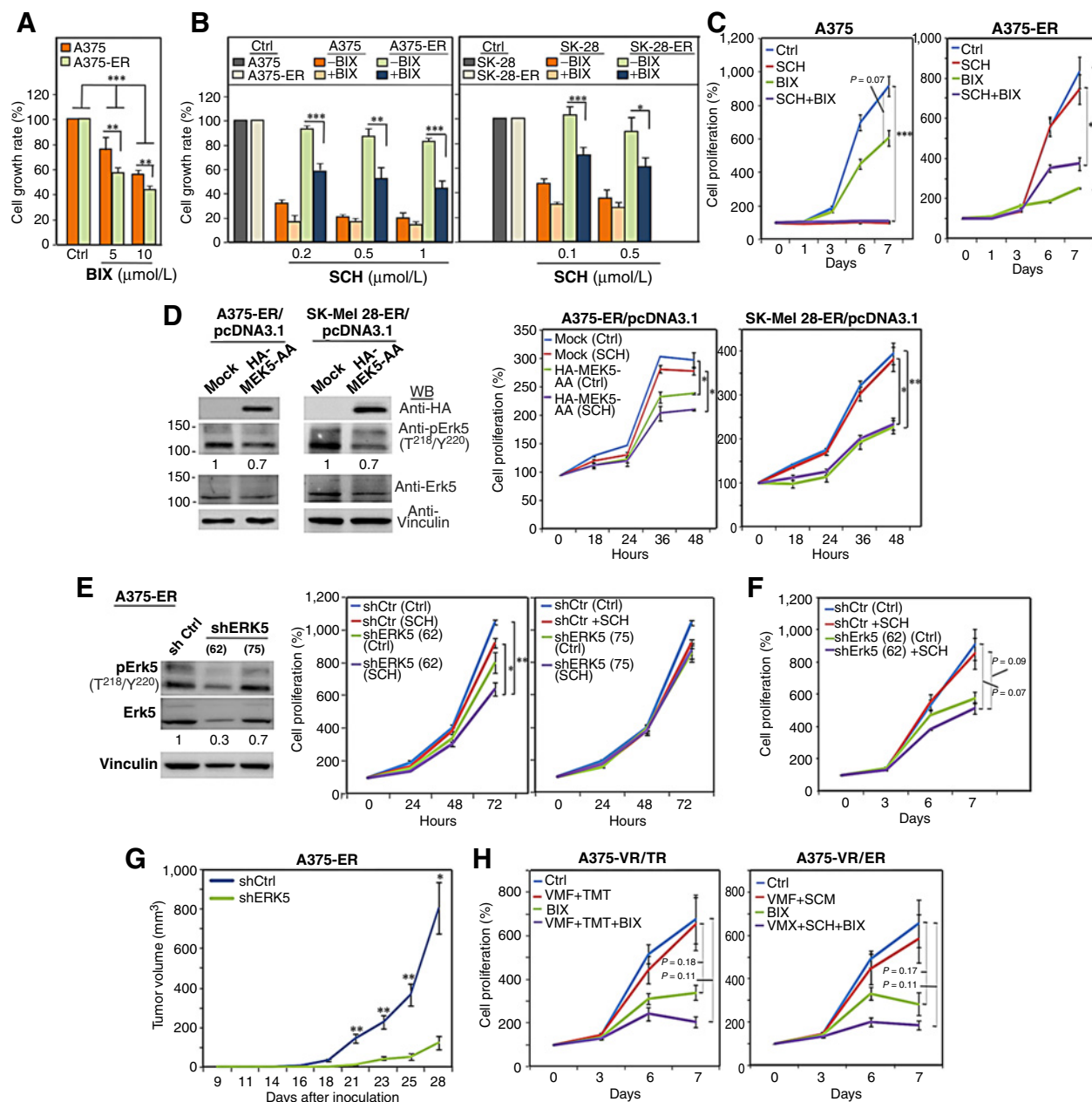


Figure 5.

Increased MEK5-Erk5 activation correlates with resistance to SCH in BRAF V600E melanoma cells. Cells were tested in MTT assays (48 hours) in the presence of BIX alone (**A**), or BIX (5 μmol/L) combined with SCH (**B**). Data are referred to untreated (Ctrl) samples (100%; $n = 4$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). **C**, Cells were incubated for the times shown without or with SCH (200 nmol/L) and/or BIX (5 μmol/L), and cellular proliferation determined by CCK8 ($n = 3$; *, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$). **D**, Left, SCH-resistant cells were transfected with empty vector (pcDNA3.1; Mock) or with an HA-tagged pcDNA3.1 vector coding for dominant-negative MEK5 (HA-MEK5-AA), and transfectants analyzed by immunoblotting, as indicated. Values under gels indicate densitometric analyses of protein gel bands showing the mean from three independent experiments. Right, transfectants were subjected to cell proliferation assays ($n = 3$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). **E** and **F**, Lentivirally generated control and Erk5-silenced A375-ER transductants (shCtrl and shErk5, respectively) were analyzed by immunoblotting (**E**, left) or tested at different time points in proliferation assays (**E**, middle and right; **F**; $n = 3$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). **G**, Tumor growth was assessed in NSG mice subcutaneously inoculated with control or Erk5-knockdown A375-ER cells ($n = 8$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). **H**, Double-resistant A375 cells were subjected to cell proliferation assays in the absence or presence of the indicated inhibitors (VMF 1 μmol/L; TMT 50 nmol/L; $n = 3$; ***, $P < 0.001$).

Confirming the sensitivity of SCH-resistant cells to LST, A375-ER cells grew significantly less in NSG mice treated with LST relative to control mice, whereas LST did not grossly affect the *in vivo* A375 cell growth (Fig. 6H). It is worth noting the consistent higher growth

rate of control A375-ER than A375 tumors, which correlates with the increased 3D spheroid growth of the resistant cells.

Inhibition of SCH-resistant cell growth by LST correlated with blockade of pErk5, whereas no LST-promoted alterations in

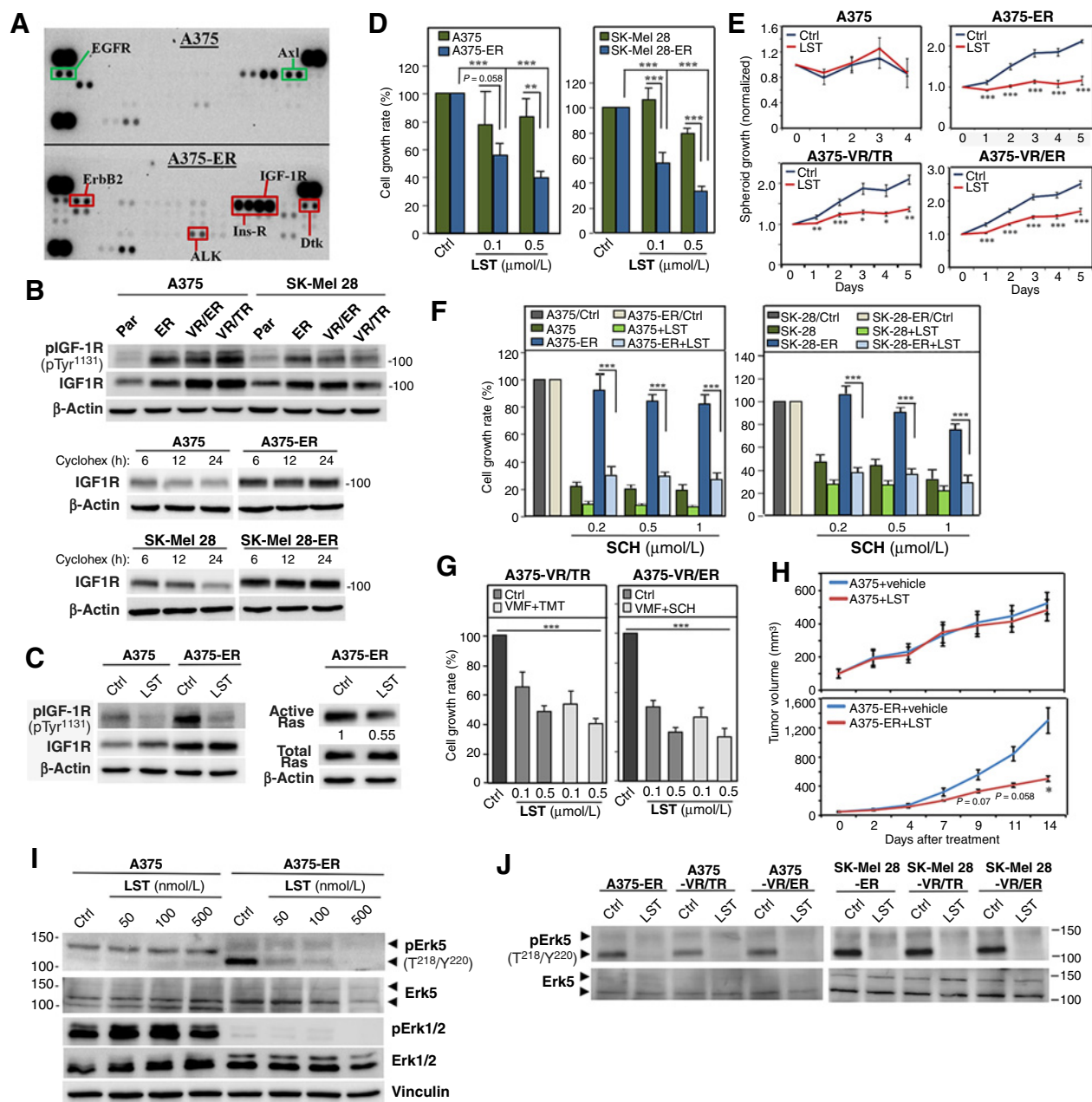


Figure 6.

Upregulated IGF1R kinase activity in SCH-resistant cells accounts for Erk5 activation and for resistance to SCH. **A**, Cells were subjected to phospho-RTK arrays. Marked are several receptors whose tyrosine kinase activity is altered. **B**, Top, cells were tested by immunoblotting using antibodies to the indicated proteins. Middle and bottom, cells were incubated for the indicated times with cycloheximide (150 μg/mL) and subjected to immunoblotting. **C**, Cells were treated without or with linsitinib (LST; 0.5 μmol/L, 48 hours) and subsequently subjected to immunoblotting (left) or to Ras GTPase assays (right). **D**, Cells were tested in MTT assays in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations of LST. Data are referred to untreated (Ctrl) samples (100%; $n = 4$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). **E**, Cells were subjected to 3D spheroid growth assays in the absence (Ctrl, DMSO) or presence of LST (1 μmol/L). Data represent normalized sphere area referred to day 0 ($n = 7$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). **F**, Cells were tested in MTT assays with SCH alone or combined with LST (0.5 μmol/L). **G**, Double-resistant cells treated with the indicated inhibitors were subjected to MTT assays ($n = 4$; ***, $P < 0.001$). **H**, NSG mice subcutaneously inoculated with A375 or A375-ER cells were treated with vehicle or LST and tumor growth assessed at the indicated times ($n = 8-10$; *, $P < 0.05$). **I** and **J**, Cells were exposed for 48 hours to the indicated concentrations of LST (**I**) or to 0.5 μmol/L of LST (**J**) and tested by immunoblotting.

pErk1/2 levels were detected in parental cells (Fig. 6I and J), suggesting that IGF1R preferentially signals to MEK5–Erk5 rather than to Erk1/2. Similar to BRAFi-resistant cells (35), IGF1R inhibition reduced Akt phosphorylation in SCH-resistant cells (Supplementary Fig. S4B). In addition, LST decreased pErk5 and pAkt in double-resistant A375 cells, as well as in SK-Mel 28-ER, SK-Mel 28-VR/TR, and SK-Mel 28-VR/ER cells (Fig. 6J; Supplementary Fig. S4C).

Parental cell supernatants rescue Erk1/2 activation in SCH-resistant cells

SCH-resistant cells are not addicted to SCH for growth (Fig. 1B) and maintain low pErk1/2 levels even after culture for 3 weeks without SCH (Fig. 7A), revealing that their sustained growth and low pErk1/2 levels were SCH independent. A possible mechanism behind the low pErk1/2 in the resistant cells is that their supernatants might lack or have reduced amounts of factors contributing to Erk1/2 activation. Of note, pErk1/2 levels in A375-ER and to a lesser extent in SK-Mel 28-ER cells exposed for 8 hours to their respective parental cell supernatants were remarkably rescued,

although they did not reach the parental cell degrees (Fig. 7B). Moreover, pErk1/2 was decreased in A375 cells incubated with A375-ER supernatants, albeit this was not consistently seen in SK-Mel 28 cells exposed to SK-Mel 28-ER supernatants. Correlating with pErk1/2 rescue, MEK5-dependent Erk5 phosphorylation and pIGF-1R levels diminished in A375-ER cells treated with parental cell supernatants, even though pErk5 and pIGF-1R were still higher than in parental cells (Fig. 7B and C). Reduced pErk5 was not detected in SK-Mel 28-ER cells exposed to their parental supernatants (Fig. 7B, right), suggesting that a minimal Erk1/2 activation threshold is needed for inhibition of Erk5 activation.

Growth factor arrays comparing A375 and A375-ER cell supernatants revealed upregulated PDGF-AA and decreased VEGF amounts in A375-ER cells (Fig. 7D; see also Supplementary Fig. S5A). As no significant alterations in the phospho-RTK arrays were observed for PDGF-R α and VEGF-R between A375 and A375-ER cells (Fig. 6A), it seemed unlikely that variations in PDGF-AA and VEGF expression could influence the differential Erk1/2 activation of the resistant cells. Indeed, VEGF did not rescue pErk1/2 in SCH-resistant cells (Fig. 7E). The expression of TGF α was also reduced

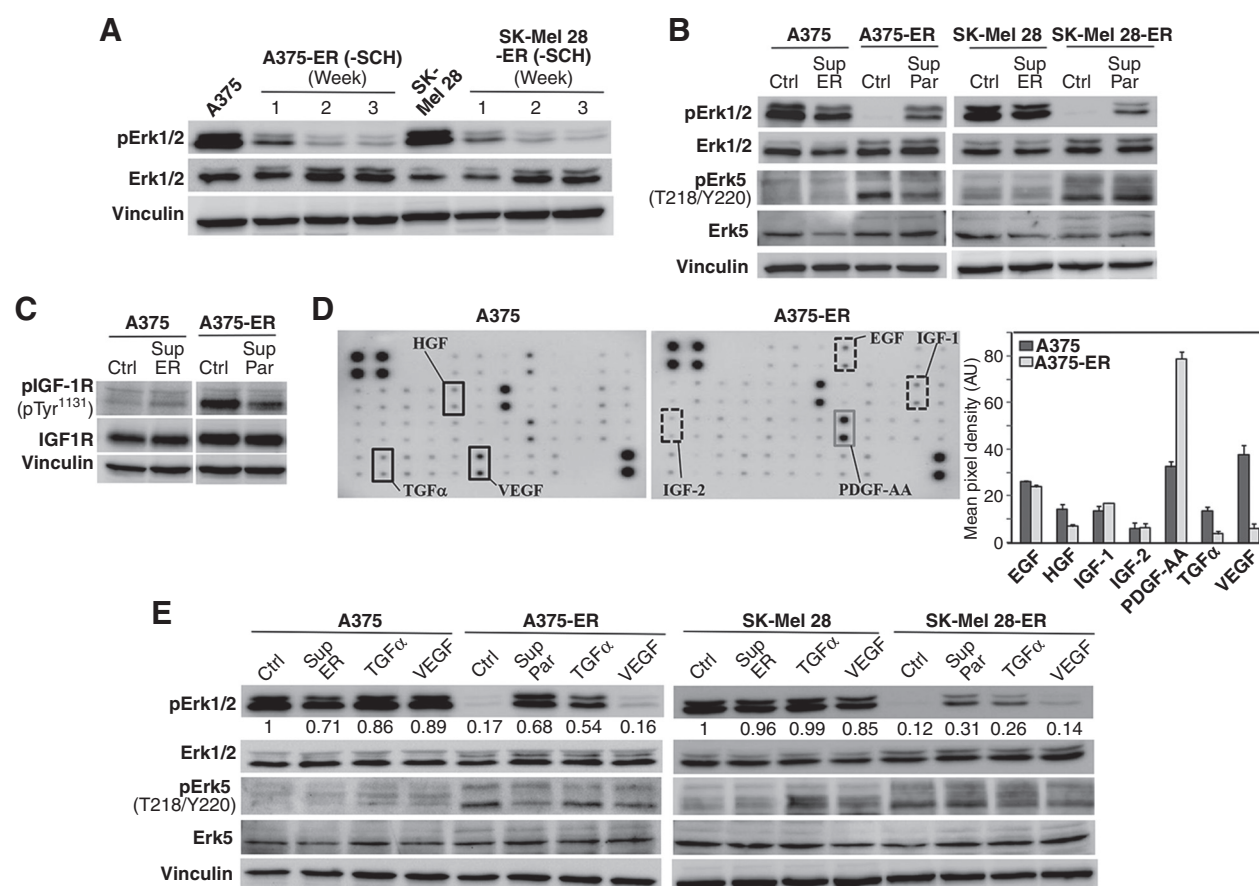


Figure 7.

Rescue of Erk1/2 activation in SCH-resistant cells by parental cell supernatants. **A**, SCH-resistant cells cultured for the indicated times without SCH (-SCH) were tested by immunoblotting. **B** and **C**, Culture supernatants (48 hours) without SCH were exchanged between parental and resistant cells, and upon 8-hour incubation (no SCH added), cell cultures were analyzed by immunoblotting. **D**, Growth factor arrays comparing A375 and A375-ER cells cultured without SCH. Most prominent changes are marked. Black and gray squares denote reduced and augmented expression, respectively. Dotted squares depict no significant alterations in expression. Quantification of some of the growth factors from the array is shown on the right plot. Results are representative of two independent experiments each by duplicate. **E**, Parental and SCH-resistant cells were incubated for 8 hours with the indicated supernatants, or with TGF α (15 ng/mL) or VEGF (50 ng/mL), and afterward analyzed by immunoblotting. Numbers under gels represent densitometric quantification of gel bands.

in the A375-ER cell supernatants (Fig. 7D), correlating with the diminished EGFR activity observed in the phospho-RTK arrays. Remarkably, TGF α partially recovered Erk1/2 activation in A375-ER and to a lesser extent in SK-Mel 28-ER cells, without significantly altering pErk5 levels (Fig. 7E). TGF α alone provided growth advantage to A375-ER relative to A375 cells, and further enhanced resistant cell growth with 1 μ mol/L SCH compared with cells incubated without TGF α (Supplementary Fig. S5B). These results suggest that TGF α might constitute a factor whose decreased expression in SCH-resistant cells could reduce pErk1/2 levels.

Characterization of SCH-resistant, N-Ras-mutant melanoma cells

We generated SCH-resistant cells of SK-Mel 103 (SK-Mel 103-ER; Supplementary Fig. S6A), a BRAF wt/N-Ras Q61R cell line. Unlike the BRAF V600E cell lines, parental and SCH-resistant SK-Mel 103 cells exhibited high pErk1/2 basal levels, which were sustained in the resistant cells incubated with SCH (Supplementary Fig. S6B, left). Moreover, SK-Mel 103-ER cells displayed higher pMEK1/2 than their parental counterparts. In addition, Ras activation was not significantly altered in SK-Mel 103-ER relative to parental cells (Supplementary Fig. S6B, right). Sequencing on the SCH-resistant cells showed no mutations at Erk1 G186 or Erk2 G169 and Q105. Contrary to A375, similar low degree of Erk5 activation was detected in SK-Mel 103 and SK-Mel 103-ER cells (Supplementary Fig. S6C), whereas resistant cells displayed stronger pAkt than parental counterparts when exposed to SCH (Supplementary Fig. S6D).

Discussion

Resistance to combined BRAF and MEK inhibition is an important clinical challenge in the treatment of metastatic melanoma. ERK inhibitors represent valuable agents currently tested in several clinical trials in melanoma, colorectal, lung, and pancreatic cancers (18, 19). The focus of our study was to characterize potential resistance mechanisms to ERKi in melanoma cells using the SCH772984 inhibitor as a model. Using two BRAF V600E melanoma cell lines, our results indicate that stimulation of the IGF1R–MEK5–Erk5 pathway opposes SCH-inhibitory actions on Erk1/2 activation and cell growth, leading to rescue of cell proliferation and acquired resistance. The involvement of the IGF1R–MEK5–Erk5 pathway is supported by data obtained with IGF1R and MEK5 inhibitors, by expression of a dominant-negative MEK5 form, and by Erk5 silencing. Upregulated IGF1R tyrosine kinase and MEK5–Erk5 activities in the resistant cells increased their sensitivity to LST and BIX inhibitors, revealing that blockade of IGF1R–MEK5–Erk5 could represent a suitable therapy to treat melanoma resistance to ERKi. Notably, LST blocked Erk5 activation in A375-ER cells and decreased their growth in 3D spheroid assays as well as in NSG mice. Together with previous observations of augmented IGF1R expression and activity in BRAFi-resistant melanoma cells (35), our data suggest that upregulated IGF1R expression could represent a common cell response to MAPKi. We provide here evidence that increased IGF1R expression in SCH-resistant cells involves enhanced IGF1R protein stability. As linsitinib inhibited IGF1R-mediated Ras and Erk5 stimulation, these data suggest that Ras constitutes an IGF1R-dependent upstream activator of MEK5–Erk5 in SCH-resistant cells. This is consistent with previous reports of Ras-mediated

MEK5–Erk5 stimulation (36, 37), although Ras-independent activation was also documented (38).

Even if SCH-resistant cells have higher Ras activation than parental cells, they display inhibition of Erk1/2–RSK activation, and full resistance to combined VMF and TMT or VMF and SCH treatments. This is likely facilitated by the mitogenic signals provided by the activated IGF1R–MEK5–Erk5 signaling. Furthermore, single MEKi or combined BRAFi and MEKi treatments activate Erk5 in melanoma (39), which could further contribute to the growth of SCH-resistant cells.

Melanoma cells double-resistant to VMF and TMT, or to VMF and SCH displayed enhanced IGF1R expression and tyrosine kinase activity, as well as IGF1R-dependent stimulation of the MEK5–Erk5 pathway, which accounted for the resistance. Correlating with increased Erk5 activation, these cells also displayed abrogation of Erk1/2 activation. Of note, reduced pErk1/2 levels were recently reported in melanoma cell lines and clinical samples displaying combined resistance to BRAFi and MEKi (40), and it revealed the involvement of the PAK kinase in the combined resistance which bypassed the ERK inhibition. As PAK is an upstream Erk5 activator (41), it will be interesting to determine a possible PAK role in the IGF1R–MEK5–Erk5 pathway in melanoma resistance. Reduced pErk1/2 is not, however, a general mechanism associated to the combined resistance, as other studies have shown frequent Erk1/2 reactivation in double-resistant cells (42, 43). Nevertheless, it is clear that important signaling interconnections exist between Erk1/2 and Erk5. Thus, Erk5 signaling rescues tumor cell proliferation upon Erk1/2 abrogation (44), and opposite activation states of these kinases were observed in melanoma cells exposed to combined VMF and TMT (39). Moreover, Erk1/2 signaling induces negative feedback on Erk5 activation, potentially involving dual specificity phosphatases (DUSP; ref. 45). Together, these data strongly suggest that the MEK5–Erk5 route might become activated and have a compensatory protective function following loss of Erk1/2-controlled negative signals, thus contributing to transducing mitogenic signals, as proposed (44). As recent data revealed Erk5 expression in melanoma tissues from patients treated with BRAFi and MEKi (refs. 27, 46; Gene Expression Omnibus public database; accession code GSE99898), and the MEK5–Erk5 pathway is activated in several cancer types (31), future studies should determine the Erk5 activation status in ERKi-resistant and in double-resistant melanoma patients.

Colorectal cancer cells exposed to SCH developed resistance based on an Erk1 Gly¹⁸⁶ to Asp¹⁸⁶ mutation, causing defective SCH binding to the kinase and retention of high pErk1/2 levels (25). Additional mutations on Erk1/2 were mapped that could confer resistance to ERKi, BRAFi, and MEKi, by also interfering with the inhibitor binding, resulting in preservation of Erk1/2 activation (47). Furthermore, treatment of K-Ras-mutant pancreatic cancer with SCH caused only transient Erk1/2 inhibition in resistant cells, which displayed enhanced basal PI3K–Akt–mTOR signaling conferring resistance (48). Our sequencing data on Erk1 and Erk2 in SCH-resistant melanoma cells tentatively suggest that SCH could bind to the kinases and exert its inhibitory actions on Erk1/2 activation. The decreased Erk1/2 activation could also be contributed by the reduced pMEK1/2 levels of the resistant cells. Reduced MEK activation might involve decreased function of kinase suppressor of Ras (Ksr) scaffold proteins, or enhanced DUSP activity (49, 50). Yet, even if the SCH-resistant cells express BRAF V600E, abrogated Erk1/2 activation was also

observed in cells maintained without SCH, raising the possibility that decreased pErk1/2 could arise from the actions of soluble mediators. Remarkably, the partial rescue of pErk1/2 in SCH-resistant cells upon incubation with SCH-free supernatants from parental cells strongly suggests that decreased pErk1/2 levels could involve reduced expression and function of soluble stimulators of Erk1/2 activation. We found that a potential activator of Erk1/2 phosphorylation is TGF α , whose expression is lower in SCH-resistant than parental cells, and whose addition to the resistant cells partially recovers pErk1/2. These findings suggest that the low pErk1/2 in ERKi-resistant melanoma cells involves intracellular alterations as well as actions of soluble mediators, and that the stable inhibition of Erk1/2 activation in these cells cultured without SCH is based on decreased expression of positive Erk1/2 regulators, including TGF α .

Contrary to BRAF V600E melanoma cells, BRAF wild-type/N-Ras-mutant SK-Mel 103 cells resistant to SCH displayed high pErk1/2 linked to low pErk5 amounts, again supporting a default role for Erk5 whose RTK-dependent stimulation is favored under repression of Erk1/2 activation.

Collectively, the present results highlight a novel route for resistance to ERKi as well as for double resistance to BRAFi and MEKi, which together with the reported Erk5 expression in melanoma tissues makes appealing following up therapeutic studies targeting the IGF1R–MEK5–Erk5 pathway.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012;26:1131–55.
2. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016;16:345–58.
3. Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol* 2001;117:1483–9.
4. Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009;41:544–52.
5. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19.
6. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010;467:596–9.
7. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507–16.
8. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-Raf(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973–7.
9. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011;480:387–90.
10. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-Raf amplification-mediated acquired B-Raf inhibitor resistance. *Nat Commun* 2012;3:724.
11. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010;468:968–72.
12. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013;19:1401–9.
13. Kidger AM, Siphthorp J, Cook SJ. ERK1/2 inhibitors: new weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway. *Pharmacol Ther* 2018;187:45–60.
14. Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, et al. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov* 2013;3:742–50.
15. Sheppard KE, McArthur GA. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:5320–8.
16. Sullivan RJ, Flaherty K. MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. *Oncogene* 2013;32:2373–9.
17. Wong DJ, Robert L, Atefi MS, Lassen A, Avarappatt G, Cerniglia M, et al. Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH772984 [corrected] against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma. *Mol Cancer* 2014;13:194.
18. Moschos SJ, Sullivan RJ, Hwu WJ, Ramanathan RK, Adjei AA, Fong PC, et al. Development of MK-8353, an orally administered ERK1/2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *JCI Insight* 2018;3. doi: 10.1172/jci.insight.92352.
19. Sullivan RJ, Infante JR, Janku F, Wong DJL, Sosman JA, Keedy V, et al. First-in-class ERK1/2 inhibitor ulixertinib (BVD-523) in patients with MAPK mutant advanced solid tumors: results of a phase I dose-escalation and expansion study. *Cancer Discov* 2018;8:184–95.
20. Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* 2002;22:270–85.
21. Montero JC, Ocana A, Abad M, Ortiz-Ruiz MJ, Pandiella A, Esparis-Ogando A. Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PLoS One* 2009;4:e5565.
22. Hernandez-Varas P, Colo GP, Bartolome RA, Paterson A, Medrano-Fernandez I, Arellano-Sanchez N, et al. Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) protein controls invasion and growth of melanoma cells. *J Biol Chem* 2011;286:18492–504.

Authors' Contributions

Conception and design: L. Benito-Jardón, M. Díaz-Martínez, A. Esparis-Ogando, J. Teixidó

Development of methodology: L. Benito-Jardón, M. Díaz-Martínez, N. Arellano-Sánchez, P. Vaquero-Morales, A. Esparis-Ogando, J. Teixidó

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Esparis-Ogando, J. Teixidó

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L. Benito-Jardón, M. Díaz-Martínez, N. Arellano-Sánchez, P. Vaquero-Morales, A. Esparis-Ogando, J. Teixidó

Writing, review, and/or revision of the manuscript: L. Benito-Jardón, M. Díaz-Martínez, A. Esparis-Ogando, J. Teixidó

Study supervision: A. Esparis-Ogando, J. Teixidó

Acknowledgments

We thank Francisco Casado-Robledillo and Olivia Barcón-Minchán for assistance in the Animal Facility, and Guillermo Padilla Alonso for help in Bioinformatics. Drs. Angeles García-Pardo, Marisol Soengas, José Luis Rodríguez-Fernández, Lola Alonso, Faustino Mollinedo, and Francesc Vinyals are acknowledged for providing useful reagents and for helpful discussions.

This work was supported by grants SAF2014-53059-R, SAF2017-85146-R, and RD12/0036/0061 to J. Teixidó, and PI15/01180 to A. Esparis-Ogando. L. Benito-Jardón is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received September 3, 2018; revised January 14, 2019; accepted February 27, 2019; published first March 4, 2019.

23. Diaz-Martinez M, Benito-Jardón L, Alonso L, Koetz-Ploch L, Hernando E, Teixido J. miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Res* 2018;78:1017–30.
24. Xue Y, Martelotto L, Baslan T, Vides A, Solomon M, Mai TT, et al. An approach to suppress the evolution of resistance in BRAF(V600E)-mutant cancer. *Nat Med* 2017;23:929–37.
25. Jha S, Morris EJ, Hruza A, Mansueto MS, Schroeder GK, Arbanas J, et al. Dissecting therapeutic resistance to ERK inhibition. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:548–59.
26. Chaikuad A, Tacconi EM, Zimmer J, Liang Y, Gray NS, Tarsounas M, et al. A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. *Nat Chem Biol* 2014;10:853–60.
27. Tusa I, Gagliardi S, Tubita A, Pandolfi S, Urso C, Borgognoni L, et al. ERK5 is activated by oncogenic BRAF and promotes melanoma growth. *Oncogene* 2018;37:2601–14.
28. Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CE, Muller J, Cross MJ. ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal* 2012;24: 2187–96.
29. Perez-Madrigal D, Finegan KG, Paramo B, Tournier C. The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs). *Cell Signal* 2012;24:2360–8.
30. Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipskind RA. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* 2003;22:5387–98.
31. Hoang VT, Yan TJ, Cavanaugh JE, Flaherty PT, Beckman BS, Burow ME. Oncogenic signaling of MEK5-ERK5. *Cancer Lett* 2017;392:51–9.
32. Hilmi C, Larribere L, Giuliano S, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R, et al. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X(L), and survivin. *J Invest Dermatol* 2008;128: 1499–505.
33. Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Patel D, Herlyn M. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res* 2001;61:7318–24.
34. Wang J, Sinnberg T, Niessner H, Dolker R, Sauer B, Kempf WE, et al. PTEN regulates IGF-1R-mediated therapy resistance in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28:572–89.
35. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 2010;18:683–95.
36. Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 1999;274: 26563–71.
37. English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem* 1999;274:31588–92.
38. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 1998;395:713–6.
39. Song C, Wang L, Xu Q, Wang K, Xie D, Yu Z, et al. Targeting BMK1 impairs the drug resistance to combined inhibition of BRAF and MEK1/2 in melanoma. *Sci Rep* 2017;7:46244.
40. Lu H, Liu S, Zhang G, Bin W, Zhu Y, Frederick DT, et al. PAK signalling drives acquired drug resistance to MAPK inhibitors in BRAF-mutant melanomas. *Nature* 2017;550:133–6.
41. Radu M, Lyle K, Hoeflich KP, Villamar-Cruz O, Koeppen H, Chernoff J. p21-activated kinase 2 regulates endothelial development and function through the Bmk1/Erk5 pathway. *Mol Cell Biol* 2015;35:3990–4005.
42. Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Hyman J, et al. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun* 2014;5:5694.
43. Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* 2015;27:240–56.
44. de Jong PR, Taniguchi K, Harris AR, Bertin S, Takahashi N, Duong J, et al. ERK5 signalling rescues intestinal epithelial turnover and tumour cell proliferation upon ERK1/2 abrogation. *Nat Commun* 2016;7:11551.
45. Sarkozi R, Miller B, Pollack V, Feifel E, Mayer G, Sorokin A, et al. ERK1/2-driven and MKP-mediated inhibition of EGF-induced ERK5 signaling in human proximal tubular cells. *J Cell Physiol* 2007;211:88–100.
46. Kakavand H, Rawson RV, Pupo GM, Yang JYH, Menzies AM, Carlino MS, et al. PD-L1 expression and immune escape in melanoma resistance to MAPK inhibitors. *Clin Cancer Res* 2017;23:6054–61.
47. Goetz EM, Ghandi M, Treacy DJ, Wagle N, Garraway LA. ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors. *Cancer Res* 2014;74:7079–89.
48. Hayes TK, Neel NF, Hu C, Gautam P, Chenard M, Long B, et al. Long-term ERK inhibition in KRAS-mutant pancreatic cancer is associated with MYC degradation and senescence-like growth suppression. *Cancer Cell* 2016;29: 75–89.
49. Lavoie H, Sahmi M, Maisonneuve P, Marullo SA, Thevakumaran N, Jin T, et al. MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* 2018;554:549–53.
50. Kidger AM, Keyse SM. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin Cell Dev Biol* 2016;50:125–32.